



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS
DE LABORATORIO Y AULA

Química

Biológica

Carrera: Lic. Biología Molecular

EQUIPO DOCENTE

Dra. FANNY ZIRULNIK. Profesora Titular

Dra. ANA CECILIA ANZULOVICH. Profesora Asociada

Dra. PATRICIA STAGNITTA. Jefe de Trabajos Prácticos

Bioq. Nac. YAMILA CARMONA VIGLIANCO. Auxiliar

Analista Biol. NATALIA GAIDO RISO. Auxiliar

AÑO: 2017

FUNDAMENTACIÓN

Desde hace más de medio siglo, los científicos han tratado de utilizar los conceptos fundamentales y las técnicas de la Química para comprender la biología de los seres vivos. La Biología Molecular emergió hace algunas décadas tomando las reglas de la Biología, la Química, la Medicina y la Genética. En este contexto, la Química Biológica le aporta el conocimiento de la metabolización y utilización de los principales grupos de macromoléculas tales como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, y de sus sillares: monosacáridos, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos, respectivamente, para la producción de energía y la biosíntesis de estructuras celulares y de otros compuestos con actividad biológica, indispensables para la vida. Además, a partir de la Química Biológica, el biólogo molecular es capaz de comprender los mecanismos de regulación de las distintas vías catabólicas y anabólicas, en diferentes situaciones fisiológicas, y termina adquiriendo una visión integral de las interrelaciones metabólicas.

OBJETIVOS DEL CURSO

Al finalizar el Curso de Química Biológica, se espera que el alumno sea capaz de:

- 1.- Comprender las propiedades generales de las enzimas y analizar sus características cinéticas y mecanismos de regulación.
 - 2.- Formular las principales vías metabólicas de degradación y biosíntesis, analizando las reacciones enzimáticas fundamentales, las relaciones entre los diferentes metabolismos y los mecanismos de regulación.
 - 3.- Describir los procesos de obtención de energía metabólica y su utilización en los distintos procesos biológicos.
 - 4.- Explicar la función de las hormonas en la regulación de los procesos metabólicos.
 - 5.- Integrar las distintas vías metabólicas y su funcionamiento en diferentes situaciones fisiológicas.
-

PROGRAMA SINTETICO

Bolilla 1: ENZIMAS. Características generales. Cinética. Mecanismos de regulación.

Bolilla 2: ENZIMAS DE OXIDO REDUCCION. Cadena respiratoria. Fosforilación oxidativa. Metabolismo de xenobióticos.

Bolilla 3: METABOLISMO. Características generales. Digestión y absorción de carbohidratos. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. Glicólisis. Metabolismo del glucógeno.

Bolilla 4: CICLO DE KREBS.VIA DE LAS PENTOSAS.Ciclo de Krebs. Naturaleza anfibólica. Vía de las Pentosas. Importancia metabólica. Biosíntesis de glucosa: gluconeogénesis.

Bolilla 5: LIPIDOS. Digestión y absorción. METABOLISMO: transporte de lípidos en el sistema circulatorio. Lipoproteínas. Degradación de ácidos grasos saturados. Beta oxidación. Oxidación de ácidos grasos no saturados. Cuerpos cetónicos.

Bolilla 6: METABOLISMO DE LIPIDOS. Biosíntesis de ácidos grasos saturados. Biosíntesis de triglicéridos y fosfoglicéridos. Metabolismo del colesterol. Acidos Biliares.

Bolilla 7: METABOLISMO DE AMINOACIDOS. Destino del grupo amino. Ciclo de la Urea. Destino del esqueleto carbonado. Importancia metabólica. Biosíntesis de aminoácidos.

Bolilla 8: METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS PURICOS Y PIRIMIDINICOS. Síntesis y degradación. Importancia metabólica. Catabolismo de purinas y pirimidinas.

Bolilla 9: METABOLISMO DEL HEMO. Biosíntesis y degradación. Pigmentos biliares.

Bolilla 10: HORMONAS: SU PAPEL EN LA REGULACIÓN METABÓLICA. Características generales. Clasificación. Propiedades. Receptores. Sistemas de transmisión de señales. Principales reguladores de las vías metabólicas: insulina, glucagón, adrenalina, glucocorticoides.

Bolilla 11: INTEGRACIÓN METABÓLICA. Papel regulador del ATP. Requerimientos de poder reductor. Centros de control de las principales vías metabólicas. Perfil metabólico de los órganos más importantes. Ciclo ayuno-alimentación.

Se realizan trabajos prácticos de laboratorio y problemas de aula. Los trabajos de laboratorio tienen por objeto enseñarle al alumno el uso de materiales biológicos, el manejo de instrumental y diferentes metodologías necesarios para analizar distintos procesos metabólicos. La resolución de problemas y ejercicios permiten fijar, aclarar y aplicar los conceptos teóricos sobre los distintos temas, los cuales serán orientados de acuerdo a cada una de las Carreras para las que se ofrece este Curso.

Programa de T.P de Aula y Laboratorio (Lic. en Biología Molecular)**a) Trabajos Prácticos de Aula**

TP N° 1 (Aula): **Enzimas**. Purificación enzimática. Unidades. Enzimas alostéricas. Isoenzimas. Enzimas reguladas por modulación covalente.

TP N°2 (Aula): **Transporte electrónico**. Cadena respiratoria. Inhibidores. Fosforilación oxidativa. Inhibidores y desacoplantes. Control respiratorio.

TP N°3 (Aula): **Metabolismo de carbohidratos** (primera parte): Vía glicolítica. Balance energético. Ciclo de Krebs: Regulación. Balance energético.

TP N°4 (Aula): **Metabolismo de carbohidratos** (segunda parte): Metabolismo del glucógeno. Regulación. Vía de las Pentosas: Regulación. Balance energético.

TP N°5(Aula): **Metabolismo de lípidos**. Lipoproteínas. Degradación de ácidos grasos. Regulación. Biosíntesis de ácidos grasos. Regulación.

TP N° 6(Aula): **Metabolismo de Aminoácidos y Nucleótidos. Metabolismo de Aminoácidos**. Transaminación. Desaminación Oxidativa. Ciclo de la Urea: Costo energético. Importancia. **Metabolismo de nucleótidos**: nucleótidos púricos, síntesis y degradación, regulación. Metabolismo de nucleótidos pirimidínicos: síntesis, regulación, requerimientos de cofactores.

TP N°7 (Aula): **Interrelaciones Metabólica**.

b) Trabajos Prácticos De Laboratorio

TP N°1 (Laboratorio): **Bioseguridad en el Laboratorio**. Introducción al manejo de instrumental de laboratorio. Curvas de Calibración. Importancia.

TP N°2 (Laboratorio): **Metabolismo de Hidratos de Carbono**: Determinación de Glucosa y LDH en Plasma en un Modelo Experimental Animal.

TP N°3 (Laboratorio): **Metabolismo de Lípidos**: Determinación de Colesterol Total y Triglicéridos, Electroforesis de Lipoproteínas, en Plasma en un Modelo Experimental Animal.

TP N°4 (Laboratorio): **Metabolismo de Aminoácidos**: Determinación de actividad de GOT y GPT por método cinético y colorimétrico en Plasma e Hígado en un Modelo Experimental Animal.

TP N°5 (Laboratorio): **Metabolismo de Nucleótidos**: Determinación de Acido Úrico en Plasma en un Modelo Experimental Animal.

REGLAMENTO DE TRABAJOS PRACTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES

ALUMNOS REGULARES

1. Los alumnos conocerán, al comenzar el cuatrimestre, las fechas y los temas de los trabajos prácticos de aula y de laboratorio, como así también las fechas de las Evaluaciones Parciales. Todo lo mencionado será informado en el avisador de la asignatura.
2. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se encontrará desarrollada en las clases teóricas así como en la guía de trabajos prácticos.
3. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.
4. Los conocimientos del alumno sobre la fundamentación teórica de los Trabajos Prácticos, serán evaluados antes, durante, o al final del desarrollo de los mismos.
5. Cada alumno llevará un cuaderno o carpeta en el que consignará los resultados y observaciones, a la manera de informe de los Trabajos Prácticos realizados. Al final de cada jornada el Jefe de Trabajos Prácticos podrá revisar y constatar los resultados obtenidos.
6. Para la aprobación de los Trabajos Prácticos el alumno deberá obtener resultados adecuados, responder satisfactoriamente las preguntas y cuestionarios de trabajos prácticos, y para ser considerado alumno regular en el curso deberá aprobar las Evaluaciones Parciales programadas y haber asistido al menos al 60% de las clases teóricas.
7. De acuerdo a la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03 y su modificatoria Ord. N° 32/14) los alumnos deberán aprobar el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y de las Evaluaciones Parciales sobre los mismos.
8. Por las mismas reglamentaciones, los alumnos tendrán dos (2) oportunidades de recuperación de los Trabajos Prácticos de laboratorio y aula, debiendo aprobar en primera instancia el 75% (o su fracción menor) de los trabajos prácticos completando la aprobación del noventa por ciento (90%) en la primera recuperación. En la segunda recuperación deberá totalizar la aprobación del cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos.
9. Para poder rendir cada evaluación parcial, los alumnos deberán tener aprobado el ciento por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyos contenidos se evalúan en dicha evaluación. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales y se aprobarán con el 65% del puntaje total.
10. Teniendo en cuenta la Ord. N° 32/14, para ser considerado como alumno regular se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de publicado el resultado del Parcial. La segunda recuperación se realizará al final del cuatrimestre. Ambas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.

ALUMNOS CON PROMOCION SIN EXAMEN FINAL

Este Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación por Promoción sin examen final. Para acceder a dicha Promoción los alumnos deberán:

- a- En el momento de inscribirse al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el plan de estudio para rendir el examen final de esta asignatura.
- b- Cumplir con la asistencia al 80% de las clases teóricas.
- c- Aprobar los trabajos prácticos de laboratorio y aula con igual exigencia que los alumnos regulares.
- d- Aprobar cada evaluación parcial con el 70% de los temas de la condición regular más el 70% de los contenidos propios de la condición promocional.
- e- Aprobar una evaluación adicional, de modalidad individual (oral) ó escrita sobre los temas restantes para completar el programa de la asignatura (sobre el tema Interrelación Metabólica)
- f- Los alumnos que opten por la Promoción sin examen final tendrán solo dos (2) recuperaciones para todas las evaluaciones Parciales. Estas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.
- g- Pérdida de la promoción: en el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el alumno será considerado regular si cumple con las respectivas condiciones de regularidad.
- h- La nota final de la materia será igual al promedio de las calificaciones obtenidas en todas las evaluaciones.

REGLAMENTO DE EXAMENES LIBRES

Sólo podrán optar por rendir la asignatura en carácter de alumno libre aquellos que habiendo **realizado los trabajos prácticos de laboratorio** hayan perdido la condición de regular por parciales no aprobados.

De esta forma el alumno tendrá que cumplimentar los siguientes requisitos:

- 1) Aprobar un cuestionario escrito sobre la fundamentación teórica de todos los temas del Plan de Trabajos Prácticos, el que contendrá problemas de aplicación.
- 2) Una vez aprobado el punto 1, se sorteará un tema del plan de trabajos prácticos vigente, que los alumnos desarrollarán en el laboratorio, previa aprobación de un cuestionario escrito específico sobre el tema sorteado.
- 3) La realización del Trabajo de Laboratorio y los resultados obtenidos serán supervisados por el Jefe de Trabajos Prácticos y considerado junto con el informe elaborado por cada alumno para su aprobación.
- 4) Cumplidos los requisitos de los puntos 1, 2 y 3, los alumnos estarán en condiciones de presentarse al Examen Final.

LIC. EN BIOLOGIA MOLECULAR – 2017 – SEGUNDO CUATRIMESTRE**CRONOGRAMA DE TEORIAS Y TRABAJOS PRÁCTICOS**

HORARIO TEORÍAS: **MARTES** **17:00 – 19:00 hs. (AULA MAGNA)**
 JUEVES **11:00 - -13:00 hs. (AULA 37)**

HORARIOS DE T.P. DE AULA: VIERNES 10:00 a 13:00 (AULA 37)

HORARIOS DE TP DE LABORATORIO: MIÉRCOLES 9:00- 12:00
(LAB. QCA BIOLOGICA)

<u>AGOSTO</u>	TEMAS
JUEVES 10	METABOLISMO. ENZIMAS (BOLILLA 1)
MARTES 15	ENZIMAS (CONT. BOLILLA 1)
<u>MIÉRCOLES 16</u>	TP LABORATORIO N°1 - BIOSEGURIDAD Y CURVA DE CALIBRACION.
JUEVES 17	ENZIMAS DE OXIDOREDUCCION. CADENA RESPIRATORIA (BOLILLA 2)
<u>VIERNES 18</u>	TP AULA N°1: ENZIMAS
MARTES 22	CADENA RESPIRATORIA (CONT BOLILLA 2)
JUEVES 24	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN (BOL.3)
<u>VIERNES 25</u>	FERIADO
MARTES 29	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. VIA GLICOLÍTICA (BOLILLA 3).
<u>MIÉRCOLES 30</u>	TP AULA N°2. CADENA RESPIRATORIA Y FOSFORILACIÓN OXIDATIVA
JUEVES 31	METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO. CICLO DE KREBS. (BOLILLA 4).
	<i>CONSULTA 1° PARCIAL</i>

SEPTIEMBRE

<i>VIERNES 1</i>	<i>1ER. PARCIAL: ENZIMAS. CADENA RESPIRATORIA.</i>
-------------------------	-----------------------------------------------------------

MARTES 5 METAB. DE HIDRATOS DE CARBONO CICLO DE. KREBS (CONT.)
ÁREA DE QUÍMICA BIOLÓGICA

MIÉRCOLES 6 **TP LABORATORIO N°2- GLUCOSA Y LDH.**

JUEVES 7 METAB. DEL GLUCÓGENO. (BOLILLA 5)

VIERNES 8 RECUPERATORIO PRIMER PARCIAL

MARTES 12 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LÍPIDOS (BOLILLA 6)

MIÉRCOLES 13 **TP AULA N°3: VÍA GLICOLÍTICA Y CICLO DE KREBS.**

JUEVES 14 LIPOPROTEÍNAS (CONT BOLILLA 6).
CONSULTA 2DO. PARCIAL.

VIERNES 15 **TP AULA N°4: VIA DE LAS PENTOSAS Y METAB. DEL
GLUCOGENO**

MARTES 19 DEGRADACIÓN DE ACIDOS GRASOS (CONT. BOLILLA 6).

JUEVES 21 FERIADO

VIERNES 22 2° PARCIAL. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO.

MARTES 26 BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS. CICLO DEL GLIOXILATO
(BOLILLA 7).

MIÉRCOLES 27 **TP LABORATORIO N°3- COLESTEROL Y TRIGLICERIDOS.
LIPIDOGRAMA**

JUEVES 28 METABOLISMO DE LIPIDOS

VIERNES 29 **RECUPERATORIO DE SEGUNDO PARCIAL**

OCTUBRE

MARTES 3 METABOLISMO DE LIPIDOS

JUEVES 5 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

VIERNES 6 **TP AULA N°5: METABOLISMO DE LIPIDOS.**

MARTES 10 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

MIÉRCOLES 11 **TP LABORATORIO N°4: ACTIVIDAD DE GOT Y GPT**

JUEVES 12 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
CONSULTA 3ER. PARCIAL

VIERNES 13 3° PARCIAL. METABOLISMO DE LÍPIDOS

MARTES 17 METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS

MIÉRCOLES 18 **TP AULA N°6A: METABOLISMO DE AMINOACIDOS**

JUEVES 19 METABOLISMO DEL HEM

VIERNES 20 **TP AULA N°6B: METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS**

MARTES 24 RECEPTORES

MIÉRCOLES 25 **TP LABORATORIO N°5 : ACIDO URICO**

JUEVES 26 HORMONAS

VIERNES 27 **RECUPERATORIO TERCER PARCIAL**

MARTES 31 INTERRELACIONES METABOLICAS

NOVIEMBRE

MIÉRCOLES 1 **TP LAB: INTEGRACION RESULTADOS DE TODOS LOS TP
DE LABORATORIO (ENTREGA DE INFORME)**

JUEVES 2 **CONSULTA 4° PARCIAL**

VIERNES 3 4° PARCIAL. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS, NUCLEÓTIDOS

MIÉRCOLES 8 **TP. DE AULA- INTEGRACIÓN METABÓLICA:
EXPOSICIÓN DE SEMINARIOS**

VIERNES 10 **RECUPERATORIO CUARTO PARCIAL**

SEGUNDAS RECUPERACIONES

SEMANA DEL 13 AL 17 DE NOVIEMBRE EN FECHAS Y HORARIOS A CONVENIR

TRABAJOS PRÁCTICOS DE AULA

TRABAJO PRÁCTICO DE AULANº 1

ENZIMAS

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Describir las propiedades generales de las enzimas.
- ✓ Comprender la cinética enzimática y mecanismos de regulación.
- ✓ Determinar gráficamente los valores de Km.
- ✓ Interpretar la acción de distintos tipos de inhibidores.

Introducción

Las enzimas catalizan prácticamente todas las reacciones biológicamente importantes en un organismo. Numerosas áreas de la biología se han beneficiado con la aplicación de los análisis enzimáticos. Son útiles, por ejemplo en el estudio de las diferentes vías metabólicas de los distintos organismos, en el diagnóstico de enfermedades tan frecuentes como el infarto de miocardio, la hepatitis, la enfermedad obstructiva hepática y las distrofias musculares, o en procesos de síntesis y/o purificación de compuestos con actividad biológica. En un sistema en estudio, la actividad enzimática puede ser normal, elevada, baja o nula, según el caso.

Una reacción catalizada por una enzima se puede esquematizar:



Así la actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido, en un tiempo dado (por ej. 1 min.), en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir, aquella cantidad de producto formado/min, o de sustrato consumido/min, obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con la cantidad total presente de la mezcla.

Para medir la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones, habitualmente se indica en **Unidades Internacionales**.

Una **Unidad de cualquier enzima** es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ($1\mu\text{mol} = 10^{-6} \text{ mol}$) de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de Enzima} = \frac{\mu\text{moles de Sustrato Transformado}}{\text{min.}}$$

Teniendo en cuenta que la mayoría de las enzimas son proteínas, con excepción de ciertas moléculas de ARN que actualmente se sabe poseen actividad catalítica, se determina la **actividad específica** que indica la pureza relativa de una preparación enzimática y relaciona la actividad enzimática, no ya al volumen de la muestra, sino al total de proteínas existentes en la misma.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\mu\text{mol de S. transformado/min. (Unidad de enzima)}}{\text{mg de proteínas}}$$

Un aumento de la actividad específica indicará que del extracto enzimático obtenido durante el proceso de purificación de una determinada enzima, se han ido eliminando proteínas que no tienen la acción catalítica perseguida. La actividad específica llega a ser máxima y constante cuando la enzima se encuentra al estado puro.

Una vez que se tiene la enzima al estado puro y se conoce su peso molecular, se puede calcular su **actividad molar o número de recambio** que corresponde al número de moléculas (o moles) de sustrato convertidos en producto por unidad de tiempo (minuto) por una molécula (o mol) de enzima, trabajando en condiciones de saturación de sustrato, lo que corresponde a la velocidad máxima en presencia de un mol de enzima.

$$\text{Índice de Cambio} = \frac{\text{moles de sustrato transformado/min.}}{\text{mol de enzima}}$$

Diversos factores modifican la actividad y deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de una enzima presente en una muestra. Ellos son: **concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia o no de inhibidores.**

Regulación de la actividad enzimática

La actividad de las enzimas en las células puede ser regulada por distintos mecanismos. En casi todas las vías metabólicas existen una ó más enzimas que actúan como reguladoras y que pueden aumentar o disminuir su actividad de acuerdo a señales específicas. Así la actividad de las enzimas en las células puede ser ajustada a los requerimientos fisiológicos, cambiantes momento a momento. Así, de acuerdo a su modo de regulación, podemos hablar de: *enzimas alostéricas* y *enzimas reguladas por modificación covalente*.

Enzimas alostéricas.

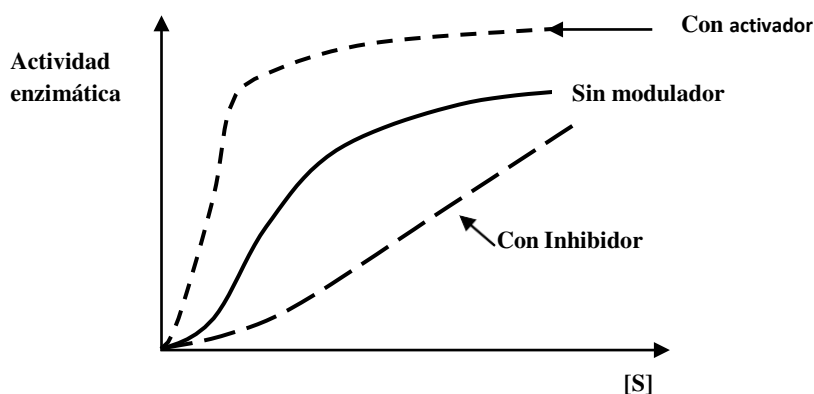
En algunas vías metabólicas, la enzima que cataliza la primera etapa de la serie suele ser inhibida por el producto de la última reacción. Cuando la concentración de ese producto final aumenta, y su síntesis

excede las necesidades de la célula, se frena el funcionamiento de la vía reduciendo la actividad de la primer enzima reguladora. En este caso se habla de **regulación por retroinhibición** y la enzima es una *enzima alostérica*. Por ejemplo, la aspartato transcarbamilasa, que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, es inhibida por citidina trifosfato (CTP) que es el producto final de esa vía metabólica.

En la estructura molecular de las enzimas alostéricas, además del sitio catalítico, existen otros sitios denominados reguladores, a los cuales se unen específicamente moléculas que ejercen acción activadora o inhibidora sobre su actividad. Estos agentes se llaman moduladores, modificadores o efectores alostéricos, que pueden ser positivos o negativos.

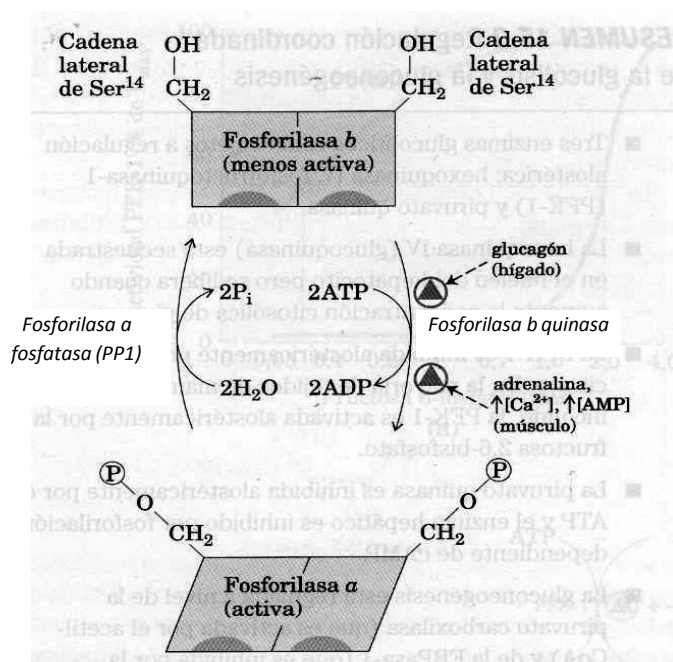
Estas enzimas están constituidas por varias subunidades polipeptídicas entre las cuales existe algún tipo de comunicación, que hace que cuando un modulador positivo o negativo se une a ellas produzca un cambio de conformación, que se transmite a las otras subunidades, de tal forma que favorece o impide la unión del sustrato al sitio activo, según se trate de un modulador positivo o negativo, respectivamente.

La cinética de estas enzimas no sigue la de las enzimas *michaelianas*, sus curvas son sigmoideas.



Modificación covalente.

Hay enzimas reguladas por agregado o sustracción de grupos unidos covalentemente. Por ejemplo, la glucógeno fosforilasa, enzima presente en músculo e hígado que inicia la vía de degradación del glucógeno. Esta enzima se encuentra en un estado de baja actividad llamada *fosforilasa b*, la cual es convertida en *fosforilasa a*, activa, por adición de restos fosfato (PO_4^{3-}) que se unen al hidroxilo de residuos de serina de la molécula de la enzima. Es decir que la actividad de estas enzimas es modulada principalmente, por la inserción covalente de grupos PO_4^{3-} , principalmente, como se muestra en el esquema a continuación:



Extraído de: LEHNINGER, A.L.,
 "Principios de Bioquímica", Ed. Omega,

Control por proteasas: activación proteolítica. Zimógenos

Ciertas enzimas son producidas en las células de origen al estado de precursores inactivos llamados *zimógenos*, *proenzimas* o *preenzimas*. La mayoría de estos precursores son proteínas simples que se convierten en enzimas activas por un proceso de hidrólisis. Ejemplos de *zimógenos* son algunos componentes de los jugos digestivos, los cuales se activan al llegar a la luz intestinal. Por ej: pepsinógeno, que en presencia de la acidez del estómago se convierte en pepsina, la enzima activa. Otro ejemplo es el tripsinógeno, secretado por el páncreas, el cual se hidroliza por la enteroquinasa a tripsina, que es la enzima activa.

Isoenzimas.

Son diferentes formas moleculares de una misma enzima. Las isoenzimas tienen **igual especificidad** de sustrato y **diferente afinidad**, es decir presentan distintos valores de K_m y V_{máx}. Por ejemplo: La hexoquinasa y la glucoquinasa (isoenzima IV de la primera) actúan sobre glucosa con un K_m de 0,1 mM y 10 mM respectivamente, catalizando la siguiente reacción:



Debido a que poseen diferente estructura aminoacídica y por lo tanto, distinto PM y/o carga, las isoenzimas se pueden separar por electroforesis en gel. Otra enzima que posee diferentes isoenzimas y ha sido bastante estudiada, es la lactato deshidrogenasa. Esta presenta cinco isoenzimas, cada una de

las cuales con una composición aminoacídica diferente y una localización tisular específica. Así, sus isoformas H4, H3M1, H2M2, H1M3 y M4, poseen el mismo sustrato (piruvato o lactato, según el sentido de la reacción) y catalizan la siguiente reacción:



La distribución relativa de la actividad enzimática entre las cinco formas es característica para cada tejido dependiendo de la función del mismo.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

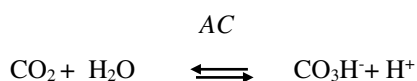
1)- Un investigador estaba tratando de purificar la acetilcolinesterasa de cerebro de rata por medio de diversas técnicas. Él reportó sus datos en la siguiente tabla pero omitió calcular algunos valores útiles.

Paso de purificación	Actividad total ($\mu\text{mol/min}$)	Proteína total (μg)
Homogenizado de tejido fresco	556.7	33,340.0
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	556.7	1,070.0
DEAE-celulosa	289.5	124.0
Concentración y diálisis	278.4	115.0
sephadex-G200	233.8	56.0
Cellex-P (intercambio catiónico)	139.2	55.4
DEAE-celulosa	89.1	11.3
DEAE-sephadex	66.8	11.1
Cromatografía de afinidad	46.8	4.8

a) Complete la tabla agregando las columnas de actividad específica y el rendimiento obtenido luego de cada paso de la purificación.

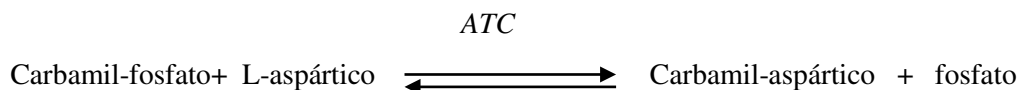
b) Analice los resultados de la tabla e indique aquellos pasos que no contribuyeron a la purificación,

2) La anhidrasa carbónica (AC) de los glóbulos rojos ($\text{PM}=30.000\text{g/mol}$) se halla entre la más activas de las enzimas conocidas. Cataliza la hidratación reversible del anhídrido carbónico, importante en el transporte del CO_2 desde los tejidos a los pulmones:



Si 10 μg de la enzima pura catalizan la hidratación de 0,30 g. de CO_2 en 1 minuto a 37°C en las condiciones óptimas, calcúlese el número de recambio (K_{cat}) de la anhidrasa carbónica en unidades de min^{-1} .

- 3) La enzima aspartato transcarbamilasa (ATC) cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidina:



En un estudio cinético sobre esta enzima aislada de *E.coli* utilizando aspártico como sustrato, en presencia de CTP 0,5 M y en ausencia del mismo, se obtuvieron los siguientes datos:

Aspártico (Molar)	v (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0,5 M
1×10^{-3}	0,45	0,20
2×10^{-3}	0,80	0,40
3×10^{-3}	1,70	0,70
4×10^{-3}	2,90	1,00
5×10^{-3}	3,40	1,40
7×10^{-3}	4,30	2,40
9×10^{-3}	5,10	3,70
10×10^{-3}	5,30	4,20
12×10^{-3}	5,60	4,80
15×10^{-3}	5,80	5,50
16×10^{-3}	5,80	5,60
17×10^{-3}	5,80	5,60

- Sin utilizar ninguna representación gráfica estílese el valor de K_m .
 - Calcúlese este parámetro utilizando la ecuación de Michaelis Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre estas dos determinaciones. Justificar.
 - ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático? Justifíquelo graficando.
- 4) La glucógeno fosforilasa es una enzima que regula su actividad por modificación covalente de su molécula. Esta enzima actúa sobre el glucógeno liberando unidades de glucosa 1-fosfato. Cuando la glucógeno fosforilasa está fosforilada es activa (fosforilasa a) y cuando se desfosforila es inactiva (fosforilasa b). Considerando este concepto, indique qué le ocurriría a la enzima en presencia de:
- Fosforilasa Quinasa y ATP
 - Fosforilasa Fosfatasa
 - Que otra enzima del metabolismo del glucógeno se vería afectada y de qué manera, cuando actúan a) ó b).

- 5) Un animal de experimentación presenta un nivel plasmático de LDH total (enzima lactato deshidrogenasa) de 400 UI/l. El valor normal estimativo de **LDH total** en el suero es de 100- 200 UI/l. La elevación de la actividad de LDH justificó hacer un análisis del patrón de isoenzimas.

La elevación de la actividad de LDH justificó hacer un análisis del patrón de isoenzimas (H_4 , H_3M , H_2M_2 , HM_3 y M_4) lo que determinó una elevación de las isoenzimas M_4 y H_2M_2 . a) De acuerdo a este resultado deduzca el origen de la lesión tisular. b) Defina isoenzima y el fundamento de su separación por electroforesis

- 6) Se realizaron estudios de inhibición para una enzima presente en suero bovino. Se varió la concentración de sustrato a en ausencia y en presencia de tres concentraciones diferentes de inhibidores. Encontrar:

a) El tipo de inhibición.

b) El valor de K_m y V_{max} .

Enzima: Transaminasa Glutámico Pirúvica.

—————→				
[2hidroxisuccínico] (mM)	0.0	1.0	2.0	5.1
[Sustrato] ↓[Glu](mM)	Velocidades	iniciales	(μmol / min / mgProt)	
0.6	0.59	0.48	0.38	0.24
1.4	1.12	0.91	0.78	0.51
2.9	1.63	1.43	1.19	0.87
5.2	1.94	1.70	1.64	1.19
8.0	2.19	1.94	1.94	1.56
10.3	2.28	2.06	1.99	1.74
16.0	2.32	2.33	2.24	1.89
25.1	2.62	2.53	2.25	2.09

GUIA DE ESTUDIO**Introducción**

- 1- Características principales de las enzimas (tipo de estructura, especificidad, velocidad).
- 2- Aplicaciones. Nomenclatura, clasificación.
- 3- Concepto de sitio activo y de sustrato
- 4- Coenzimas y grupos prostéticos. Características estructurales, similitudes y diferencias
- 5- Medidas de la actividad de enzimas. Significado.
- 6- Inhibición. Tipos. Gráficas.

Isoenzimas y zimógenos

- 7- Definición. Propiedades. Modo de separación. Ejemplos.
- 8- Diferencias con zimógenos o proenzimas. Ejemplos.

Enzimas reguladoras

- 9- Importancia de la regulación metabólica. Regulación mediata e inmediata
 - 10- Modificación de la actividad de enzimas preexistentes. Tipos de enzimas reguladoras. Ubicación en las vías enzimáticas.
 - 11- *Enzimas alostéricas*. Características estructurales. Propiedades. ¿Cómo se denominan los modificadores de la actividad enzimática? ¿Qué entiende por retroinhibición? Ejemplos
 - 12- *Modulación covalente*. Características. Ejemplos.
-

TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 2

TRANSPORTE ELECTRÓNICO-FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- ✓ Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- ✓ Interpretar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.

Introducción

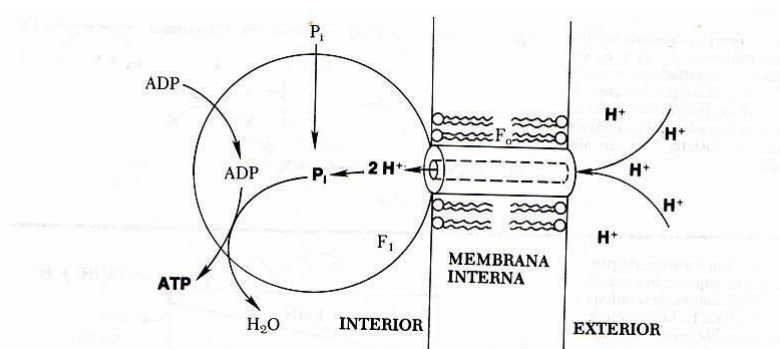
Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los alimentos, en energía química de enlaces anhídrido de ácido del ATP. La mayor parte de la síntesis de ATP se realiza en condiciones aeróbicas, durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al Ciclo de Krebs, principalmente como Acetil-CoA, pero también como otros intermediarios del ciclo, los cuales al ser oxidados hasta CO_2 y H_2O , producen, a través de la acción de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (Hidrógenos y electrones) que son transportados a través de la cadena respiratoria localizada en la membrana interna mitocondrial hasta el oxígeno, para formar agua.

La energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar H^+ al exterior de la matriz mitocondrial, formándose un gradiente de concentración de H^+ en el espacio intermembrana, que al ingresar a través del canal de la ATP sintetasa ($\text{F}_1\text{-F}_0$) proporcionan la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i). El proceso se denomina **fosforilación oxidativa**.

Fosforilación oxidativa

La energía producida por la transferencia de electrones es aplicada a la síntesis de ATP.

La **teoría quimiosmótica** sostiene que el proceso de transporte electrónico actúa como un sistema translocador de protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana, originando un gradiente de protones y creando una diferencia de potencial eléctrico entre ambas caras. Como la membrana interna es impermeable a los protones, estos sólo la pueden atravesar por estructuras que permiten eludir la apolaridad de la capa. Estos sitios corresponden a la fracción proteica F_0 del complejo $\text{F}_1\text{-F}_0$ (ATP sintetasa). Dos protones ingresan a la proteína F_0 , que provee un canal iónico a través de la bicapa lipídica y al llegar a F_1 , se activa la ATP sintetasa y se genera ATP. En la siguiente figura se muestra el pasaje de protones a través de la membrana y la síntesis de ATP.



Gradiente de Protones en la formación de ATP. F₀ se considera un canal iónico para los H⁺.

Inhibidores

Algunos compuestos **actúan inhibiendo la transferencia de electrones** y de este modo impiden la síntesis de ATP.

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona Amital Clorpromazina	Insecticida Barbitúrico: induce el sueño Sedante	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la Coenzima-Q
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit b a cit c ₁
Cianuro Monóxido de carbono Azida sódica	Veneno Gas tóxico Sustancia tóxica	Inhiben la citocromo oxidasa. Cianuro y azida reaccionan con la forma férrica del hemo y el CO con la ferrosa.

Otros inhibidores **bloquean directamente la fosforilación**, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, la oxidación también se bloquea.

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de F ₀ .

Desacoplantes

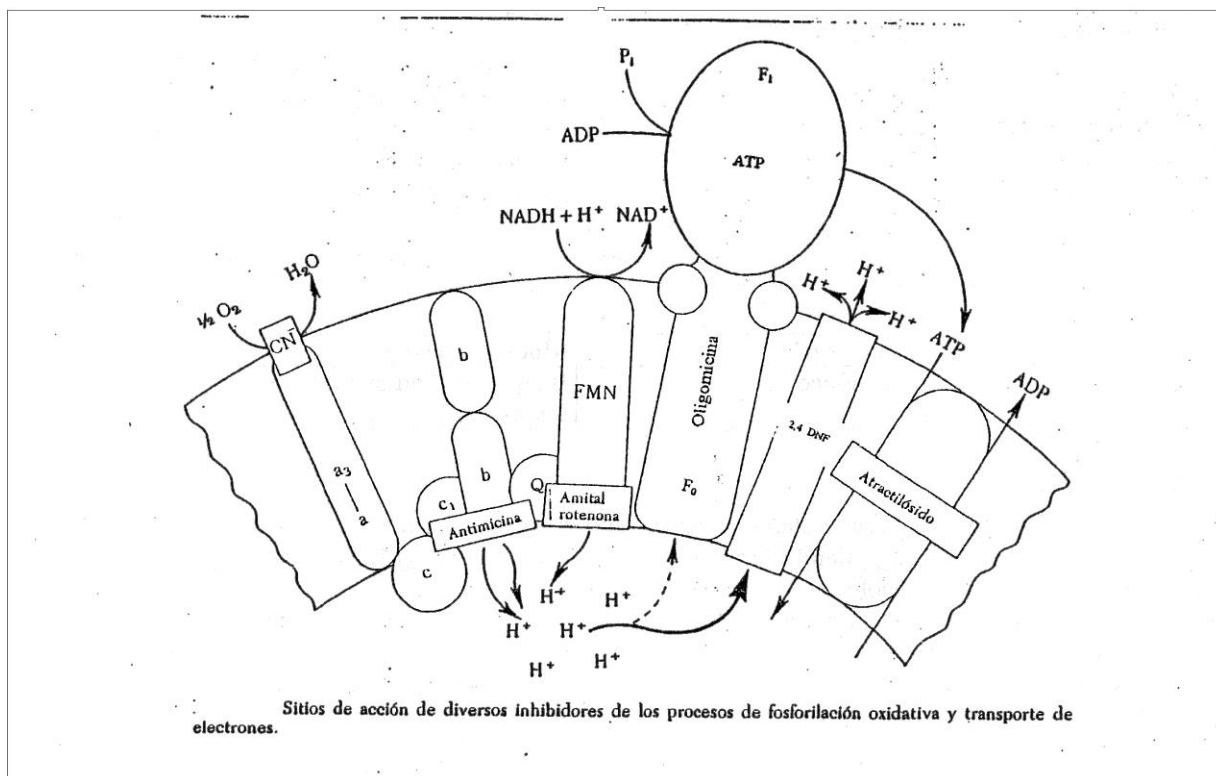
Son compuestos que desconectan el acoplamiento que existe entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, **impidiendo la síntesis de ATP sin inhibir el flujo de electrones** hacia el O₂. Ejemplo: 2,4-dinitrofenol y dicumarol.

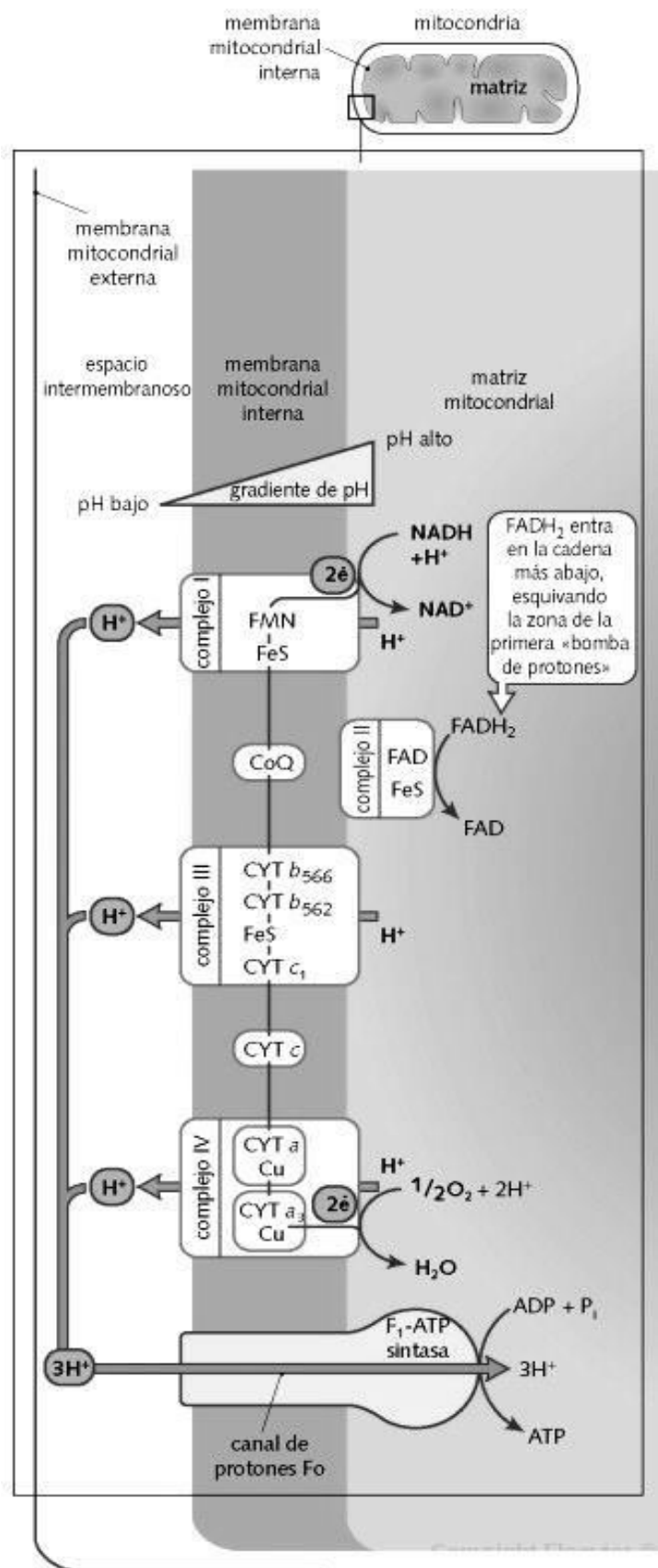
Estos agentes son sustancias **liposolubles** que se ubican en la membrana interna de la mitocondria y descargan el gradiente de protones generado por el transporte electrónico.

Se comportan como ionóforos de protones haciendo regresar los mismos a la matriz mitocondrial. De esta forma, promueven el flujo inverso de protones, a través de la membrana, disipando la fuerza motriz protónica e inhibiendo la síntesis de ATP.

Inhibidores de la Fosforilación Oxidativa

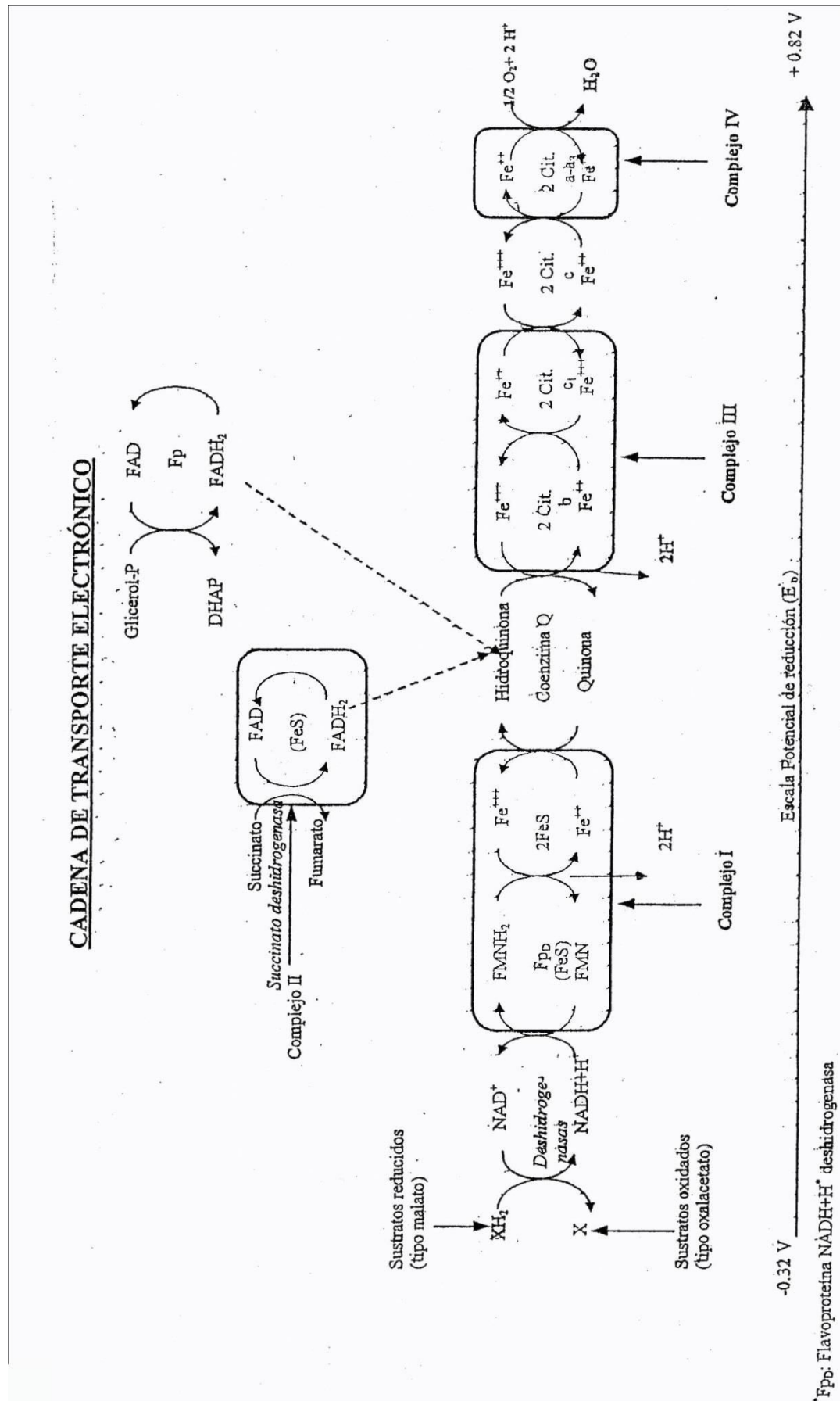
La **Oligomicina** es un antibiótico derivado de los actinomicetes, que actúa como **inhibidor de la fosforilación**. El bombeo de protones continúa hasta que se produce una saturación del mismo y esto provoca el cese del transporte. La fuerza protón motora se genera pero no es neutralizada por la formación de ATP, se produce, por lo tanto, una presión negativa que **impide el transporte de electrones**.





Fosforilación oxidativa asociada al transporte de electrones

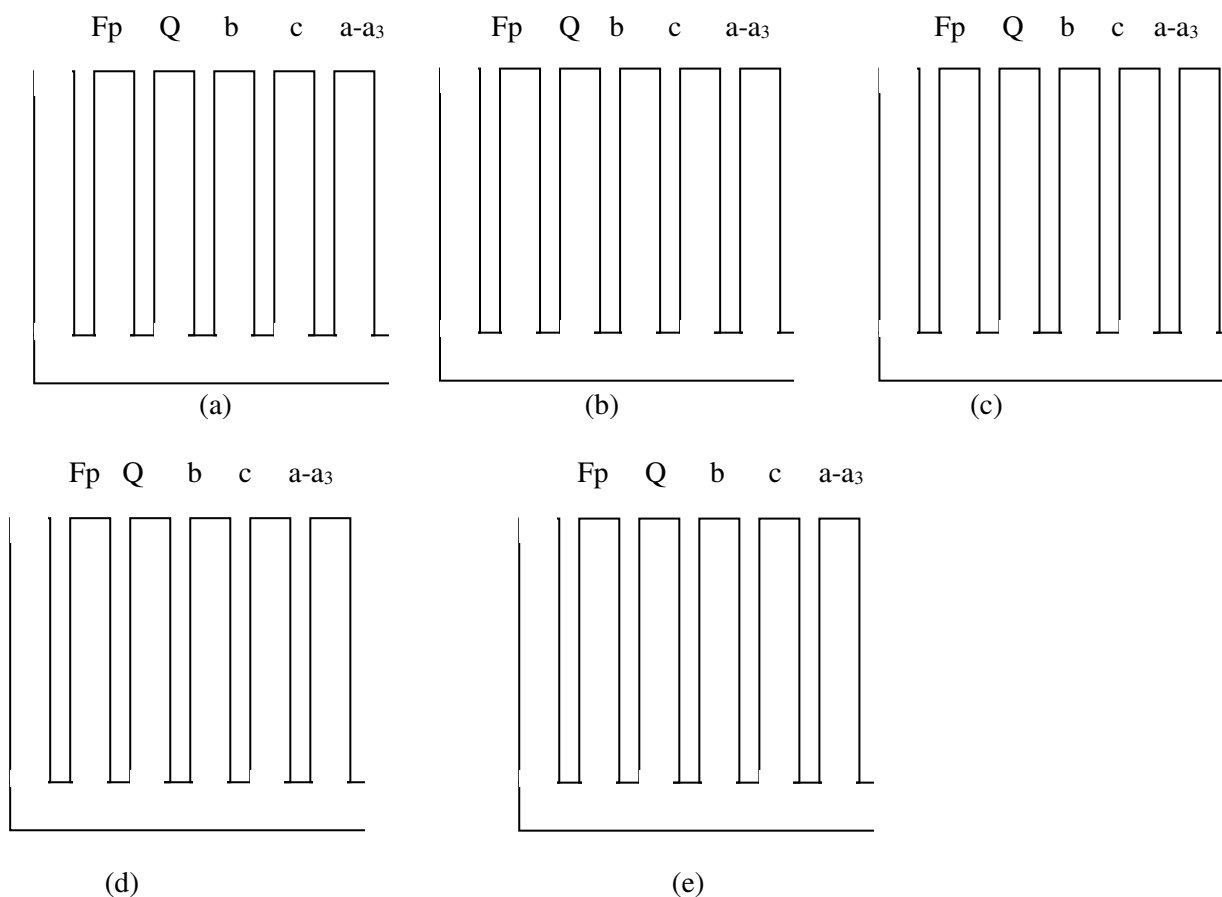
Extraída de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S.Harcourt Brace, 1998



PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1) El grado de reducción de cada transportador electrónico en la cadena respiratoria está determinado por las condiciones existentes en la mitocondria. Dibújese la analogía hidráulica apropiada con la cadena respiratoria, para cada una de las condiciones indicadas:

- Aporte abundante de NADH y de O_2 .
- Aporte abundante de O_2 pero no hay NADH.
- Aporte abundante de NADH y O_2 , pero se le añade antimicina
- Aporte abundante de NADH pero no hay oxígeno.
- Aporte abundante de NADH y de O_2 , pero se le añade cianuro.



2) ¿Cuál es el efecto de cada uno de los siguientes inhibidores sobre el transporte electrónico y la formación de ATP por la cadena respiratoria?

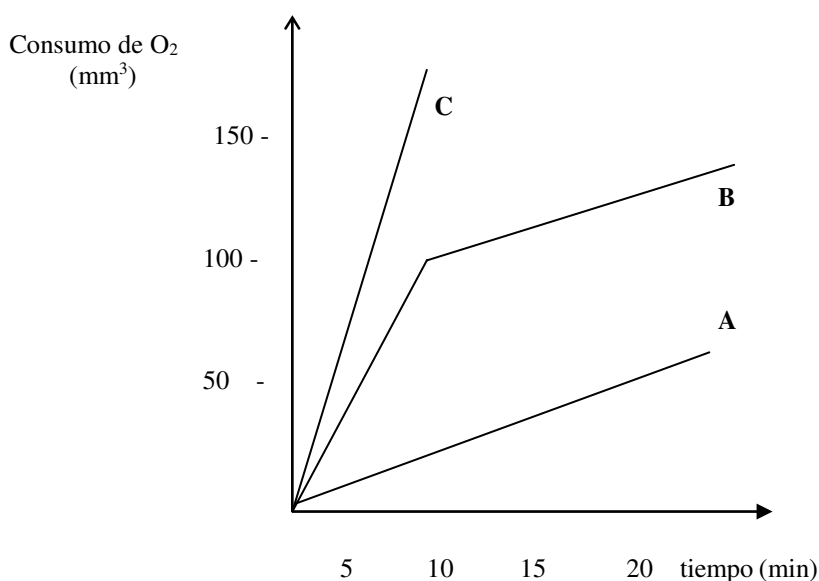
- | | | |
|-----------------|-----------------------------|------------|
| a) Oligomicina | c) Rotenona | e) 2,4 DNF |
| b) Antimicina A | d) Monóxido de carbono (CO) | |

- Indicar la relación P/O en cada uno de los ítems.
- Efecto sobre el transporte de electrones y formación de ATP

3) El consumo de O_2 fue medido en tres vasos de Warburg que contenían lo siguiente:

VASO A:	VASO B :	VASO C:
- mitocondrias de hígado de rata	- ídem A	- ídem A y B
- 21 μ moles de α -cetoglutarato	- + Hexoquinasa de levadura	- + 2,4-dinitrofenol
- 30 μ moles de fosfato	- + 35 μ moles de glucosa	
- ATP, citocromo C y $MgSO_4$		

Se graficaron las siguientes curvas con los resultados indicados. Explique las diferentes gráficas.



4) Durante la Segunda Guerra Mundial se descubrió que los trabajadores de las fábricas de municiones perdían peso de forma rápida. Los estudios condujeron a la identificación del agente causante: el 2,4 dinitrofenol que, aunque llegó a utilizarse en tratamientos adelgazantes, dejó de utilizarse debido a su toxicidad. ¿Cómo podría explicarse este efecto?

5) El gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a $30^\circ C$ y a pH 7,5. Caracterice cada uno de los compuestos agregados (B, C, E, F, G, H). Justifique brevemente el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de O_2 .

B: ADP + P_i u Oligomicina

E: 2,4-DNF u Oligomicina

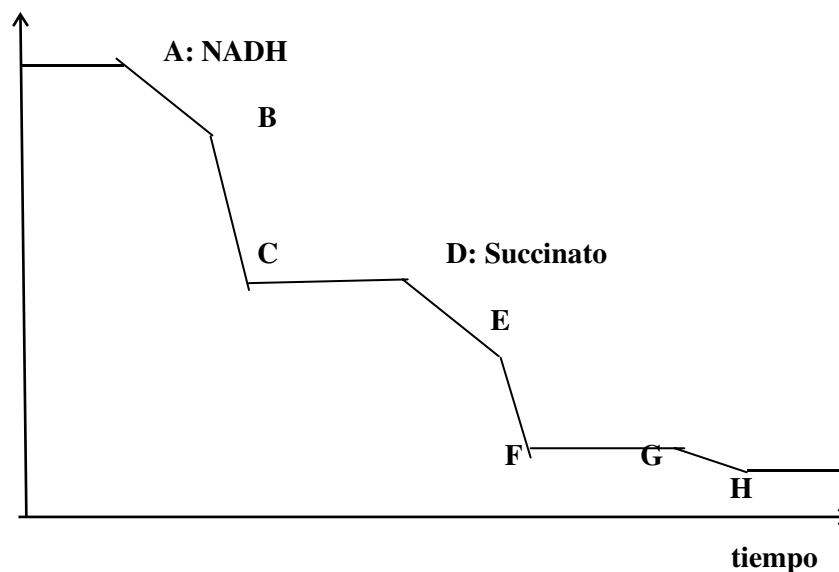
G: Malonato o Succinato

C: Rotenona o Antimicina

F: Malonato o Succinato

H: CN^- o Amital

Concentración
de O_2



GUIA DE ESTUDIO

Transporte electrónico

- 1- Mitocondrias. Estructura.
- 2- Clases de enzimas y transportadores de electrones. Potencial de reducción
- 3- Ubicación de los transportadores en la cadena respiratoria. Complejos.
- 4- Inhibidores del transporte de electrones. Características. Puntos de inhibición. Ejemplos.
- 5- Estado redox de los transportadores antes y después de la inhibición.
- 6- Desacoplantes, modo de acción. Ejemplos.
- 7- ¿De que manera afectan los inhibidores y los desacoplantes al transporte de electrones y al consumo de oxígeno?
- 8- ¿Cómo se modifica la formación de ATP en presencia de desacoplantes y/o de inhibidores?
- 9- Relación fósforo-oxígeno (P/O).
- 10- Explique el accionar de Oligomicina.

Fosforilación oxidativa

- 11- Complejo de la ATPasa. Localización. Estructura
- 12- Fosforilación oxidativa. Translocasas.
- 13- Hipótesis quimiosmótica. Justificación experimental.
- 14- Control respiratorio por el aceptor

TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N°3

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS. VIA GLICOLÍTICA-CICLO DE KREBS

Objetivos

Que el alumno adquiera los conocimientos que le permitan:

- ✓ Comprender los mecanismos de digestión y absorción de los hidratos de carbono.
- ✓ Describir los mecanismos de transporte de monosacáridos a través de membrana.
- ✓ Formular las reacciones enzimáticas, indicando mecanismos de regulación y balance energético de la vía glicolítica.
- ✓ Describir la secuencia de reacciones que integran el ciclo de Krebs, enzimas, puntos de regulación, balance energético.

Absorción intestinal de monosacáridos.

Sólo los monosacáridos son absorbidos en el lumen intestinal, por pasaje a través de las células epiteliales de la mucosa hacia el torrente sanguíneo.

El transporte de glucosa y galactosa a través del borde ciliado de la célula de la mucosa tiene lugar por un **proceso activo** que requiere energía e involucra una proteína transportadora específica y la presencia de iones sodio. Este mecanismo de transporte tiene lugar en las células epiteliales del intestino y en los túbulos renales.

Una vez que la glucosa ha sido absorbida a nivel intestinal, pasa a los capilares sanguíneos por **difusión facilitada** y de allí a la circulación general para ser distribuida a los diferentes tejidos. Como la molécula de glucosa no es lo suficientemente pequeña como para difundir directamente dentro de las células, esta difusión es facilitada por una familia de transportadores de glucosa presente en las membranas celulares de los diferentes órganos y tejidos.

DISTRIBUCIÓN DE ALGUNOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA		
Transportador	Localización	Función
SGLUT-1	Membrana apical de las células intestinales y renales.	Específico para glucosa y galactosa. Introduce glucosa <u>contra gradiente</u>
GLUT-1	Presentes en las membranas plasmáticas de casi todas las células fetales, en adultos se encuentran en cerebro, eritrocito, fibroblastos	Transporte basal de glucosa a las células a velocidad relativamente constante (elevada afinidad por glucosa)
GLUT-2	Hígado y células β del páncreas. Células epitelio intestinal, túbulos renales.	Menor afinidad por glucosa que GLUT-1, sólo están activos cuando la glucemia está elevada. También transportan galactosa y fructosa.

GLUT-3	Principal transportador en cerebro y nervios periféricos	
GLUT-4	Músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo	Insulino-dependiente: músculo y adiposo “almacenan” estos transportadores en vesículas intracelulares. En presencia de insulina, las vesículas se fusionan con la membrana aumentando el número de GLUT-4. De este modo insulina estimula la captación de glucosa por el músculo y tejido adiposo.
GLUT-5	Transporta fructosa	

Afinidad: GLUT-4 > GLUT-3 > GLUT-1 > GLUT-2

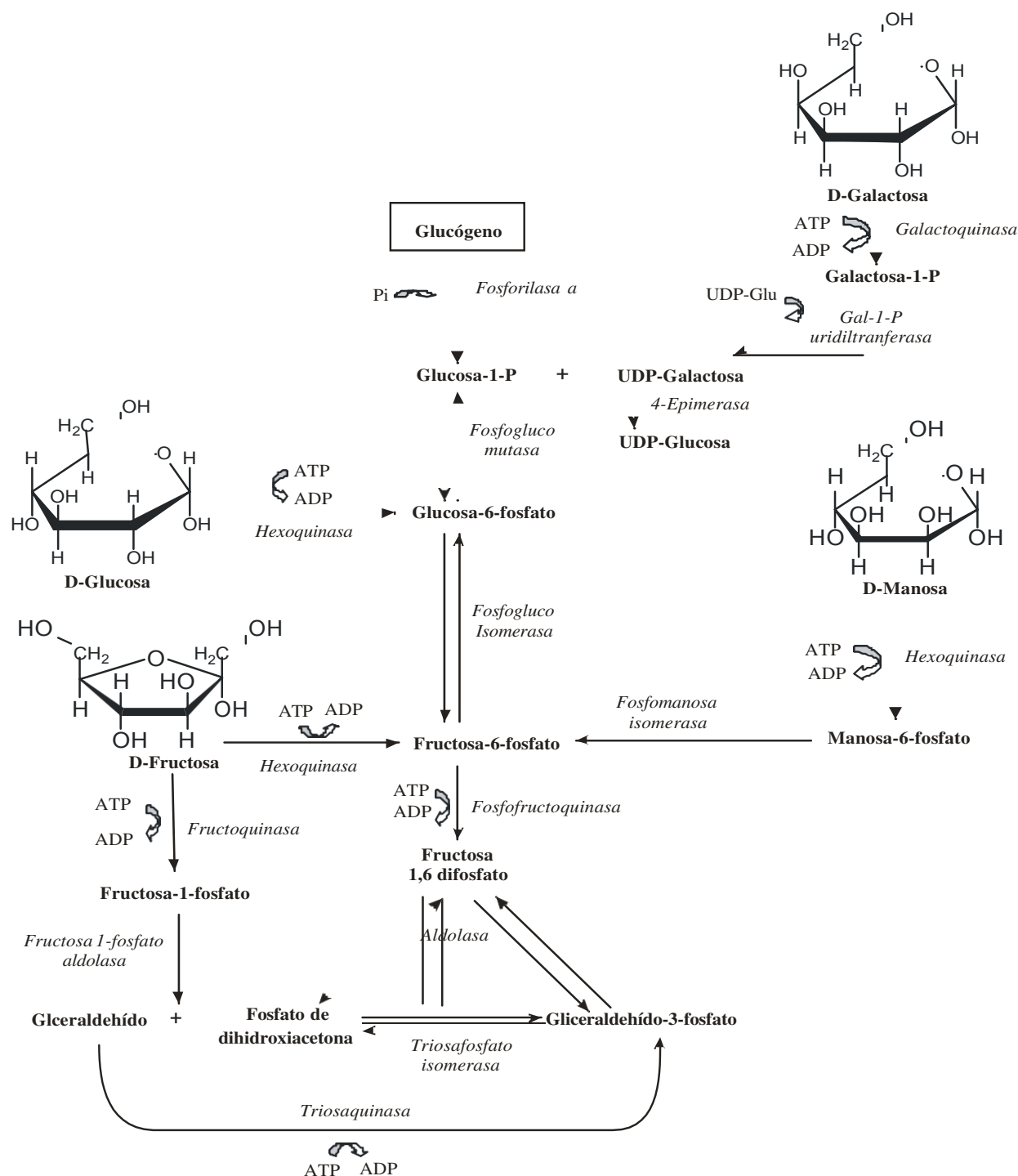
Vía glicolítica

La glicólisis es una ruta central, casi universal, del catabolismo de la glucosa no solamente en animales y plantas sino también en muchos microorganismos. En todas las células, el metabolismo de los hidratos de carbono produce primero piruvato y lactato en anaerobiosis, en el citoplasma (ver esquema). Esto se logra mediante intermediarios fosforilados con la formación de una cantidad limitada de ATP.

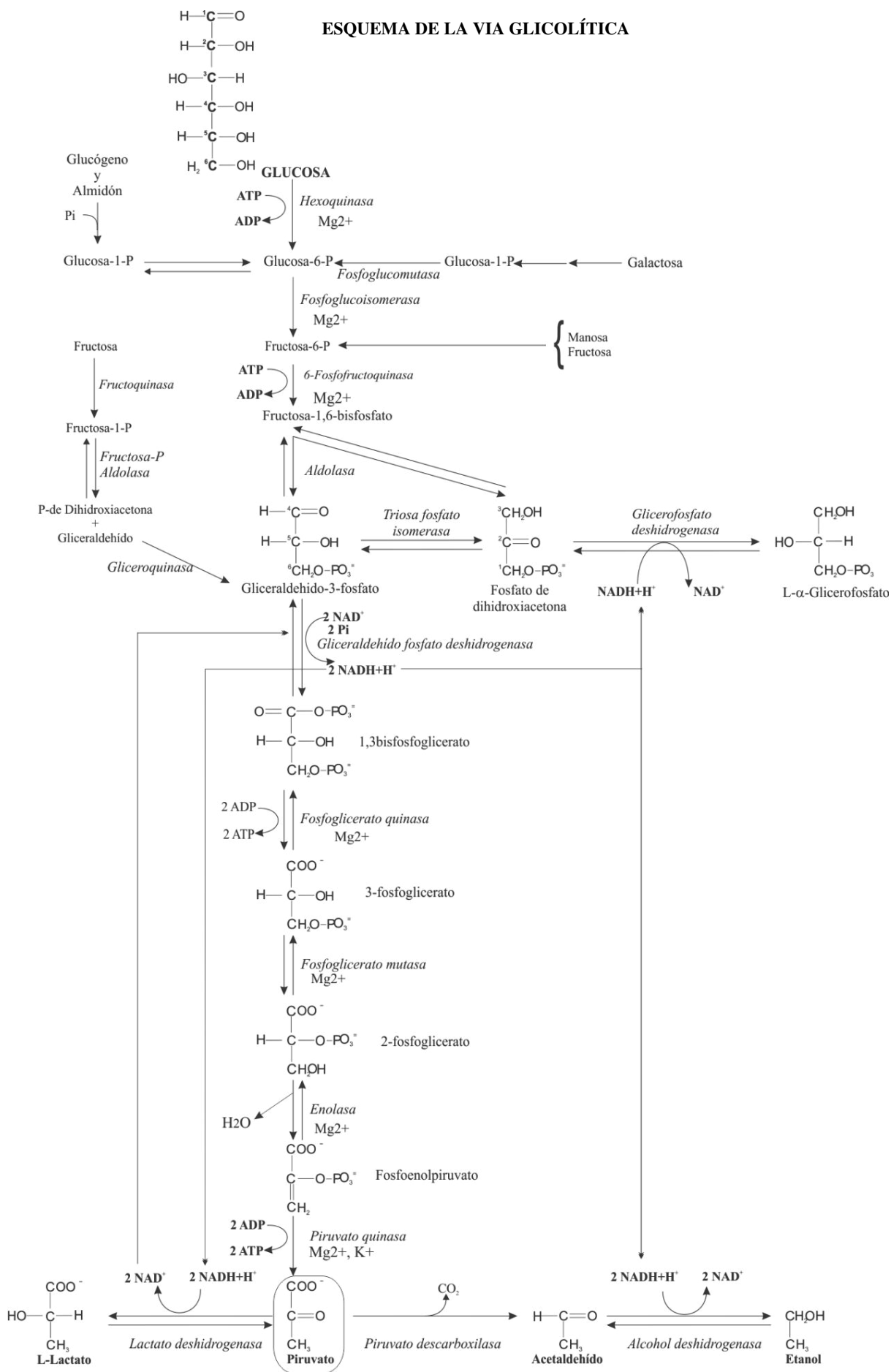
El piruvato producido en la glicólisis ingresa en las mitocondrias siendo oxidado allí a CO_2 y H_2O en aerobiosis con fosforilación oxidativa y formación de ATP asociada.

Rutas de “alimentación” que conducen desde glucógeno y otros carbohidratos a la vía glicolítica

Además de la glucosa, muchos carbohidratos se incorporan en último término a la secuencia glicolítica para experimentar degradación que rinde energía. Por ejemplo, los monosacáridos fructosa, galactosa y manosa.



En la mayor parte de las células, las enzimas que promueven la glucólisis se hallan presentes en el citosol de la célula. Por el contrario, las enzimas de la fase aeróbica en la oxidación de carbohidratos, se hallan localizadas en la membrana interna y en la matriz mitocondrial de las células eucariotas.



Puntos de Regulación de la Glicólisis.

Como en todas las rutas metabólicas la velocidad de la glicólisis está sujeta a control, el cual se realiza en tres etapas, donde están involucradas tres reacciones químicas irreversibles:

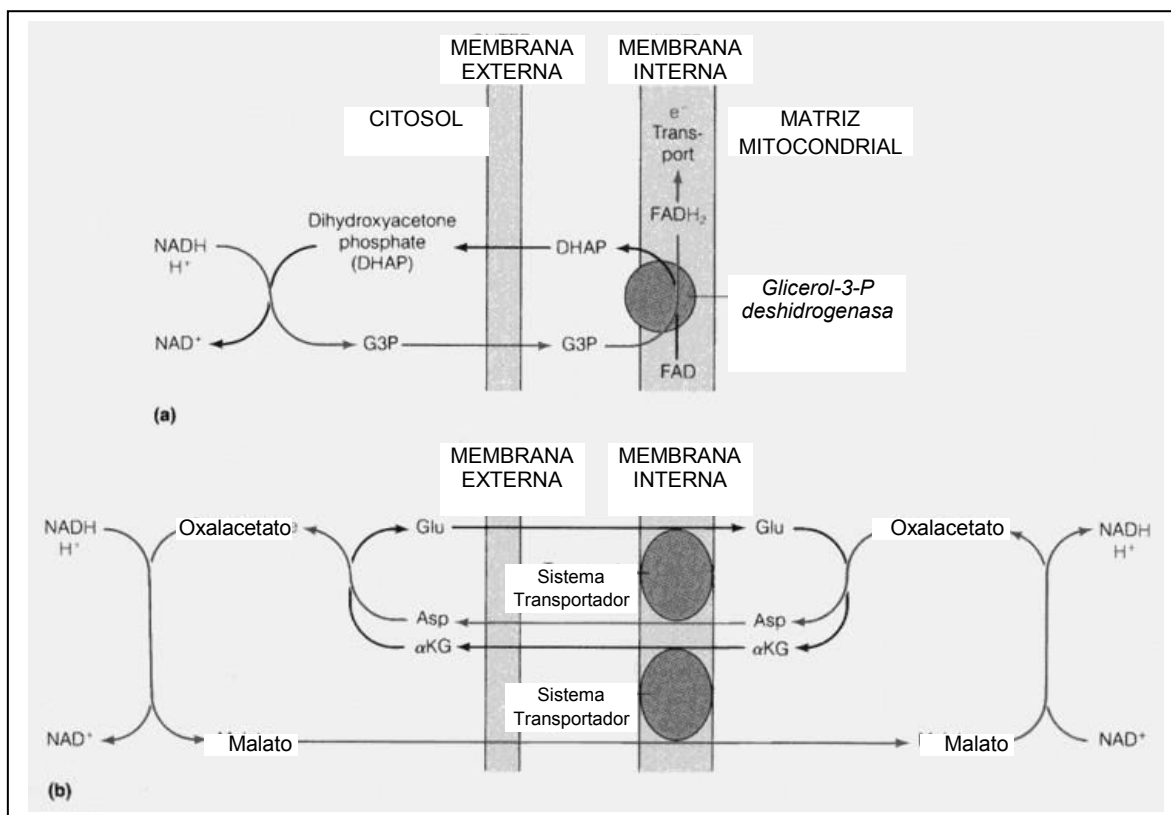
1° Punto de Control: A nivel de la *Hexoquinasa*. La actividad de la enzima es regulada por la concentración de su principal producto, **la glucosa-6-fosfato**, el cual inhibe su actividad.

2° Punto de Control: A nivel de la *Fosfofructoquinasa*, la cual es una enzima alostérica, por lo tanto, su actividad es regulada por varios efectores. Su actividad es incrementada por el **ADP, AMP y fructosa 2,6 bisfosfato** y es inhibida por **ATP, NADH, Citrato y Ac. Grasos de cadena larga**. Este es el principal punto de control de la vía glicolítica.

3° Punto de Control: A nivel de la *Piruvato quinasa*. Es activada por la **fructosa-1,6- bisfosfato** y es inhibida por el **ATP**. También es regulada por fosforilación reversible, siendo inhibida por el AMP_c y el Ca^{++} .

Sistemas lanzadera o conmutadores de hidrógeno

En condiciones aeróbicas, los equivalentes de reducción del $\text{NADH} + \text{H}^+$, que se generan en el citosol a partir de la glucólisis, deben ser translocados al interior de las mitocondrias a fin de, por un lado, reoxidar el NADH para que la glucólisis pueda proseguir, y por otro, ceder dichos equivalentes a la cadena de transporte electrónico y obtener energía en forma de ATP. La impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al NADH exige que la translocación de H desde el citosol a la cadena de transporte electrónico sea llevada a cabo por sistemas conmutadores de H localizados en la membrana interna de las mitocondrias. Existen dos sistemas conocidos hasta ahora y esquematizados en la figura: la Lanzadera del Glicerofosfato, abundante en músculo esquelético y cerebro (a), y la de Malato-Aspartato, muy activo en hígado, riñón y corazón (b).



Ciclo De Krebs

El Ciclo de Krebs o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos, es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de Acetil-coenzima A, derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos.

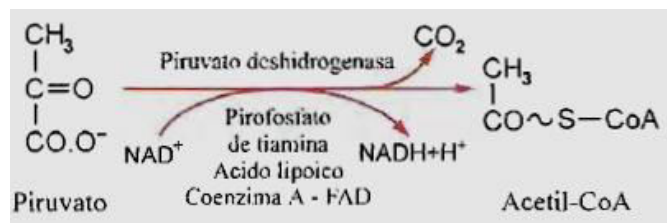
El Ciclo está catalizado por un sistema multienzimático que acepta como combustible al grupo acetilo de Acetil-coenzima A, degradándolo hasta CO₂ y pares de H y e⁻. Estos últimos son conducidos a través de una cadena de transportadores de hidrógenos y electrones, hasta el O₂, aceptor final, que se reduce y forma H₂O, en lo que se denomina “cadena respiratoria”.

Estas secuencias de reacciones enzimáticas tienen lugar en los organismos aerobios. En aerobiosis, el ácido pirúvico proveniente principalmente de la degradación de la glucosa, sufre una descarboxilación oxidativa catalizada por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa, produciéndose acetil-coenzima A.

Descarboxilación oxidativa de piruvato

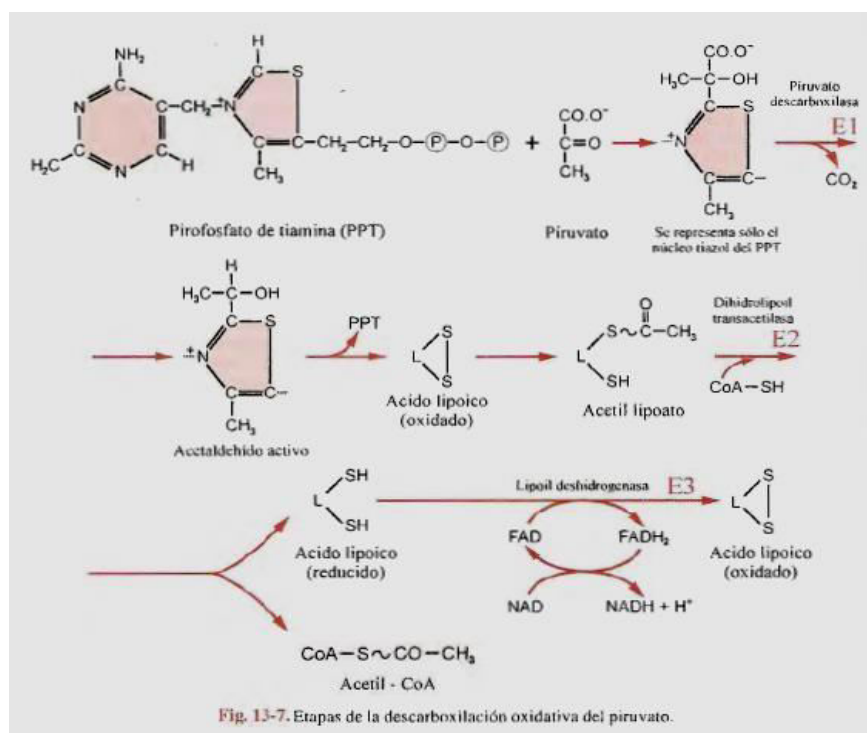
El piruvato obtenido en la vía glicolítica en el citosol, en condiciones aeróbicas ingresa a la matriz mitocondrial a través de un transportador de la membrana interna de estas organelas, donde será

metabolizado a acetil CoA por el complejo multienzimático de la *Piruvato deshidrogenasa*. Este complejo está constituido por tres enzimas: *Piruvato descarboxilasa* o E_1 , *Dihidrolipoil transacetilasa* o E_2 , y *dihidrolipoil deshidrogenasa* o E_3 , y requiere de cinco coenzimas: pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, FAD y NAD.

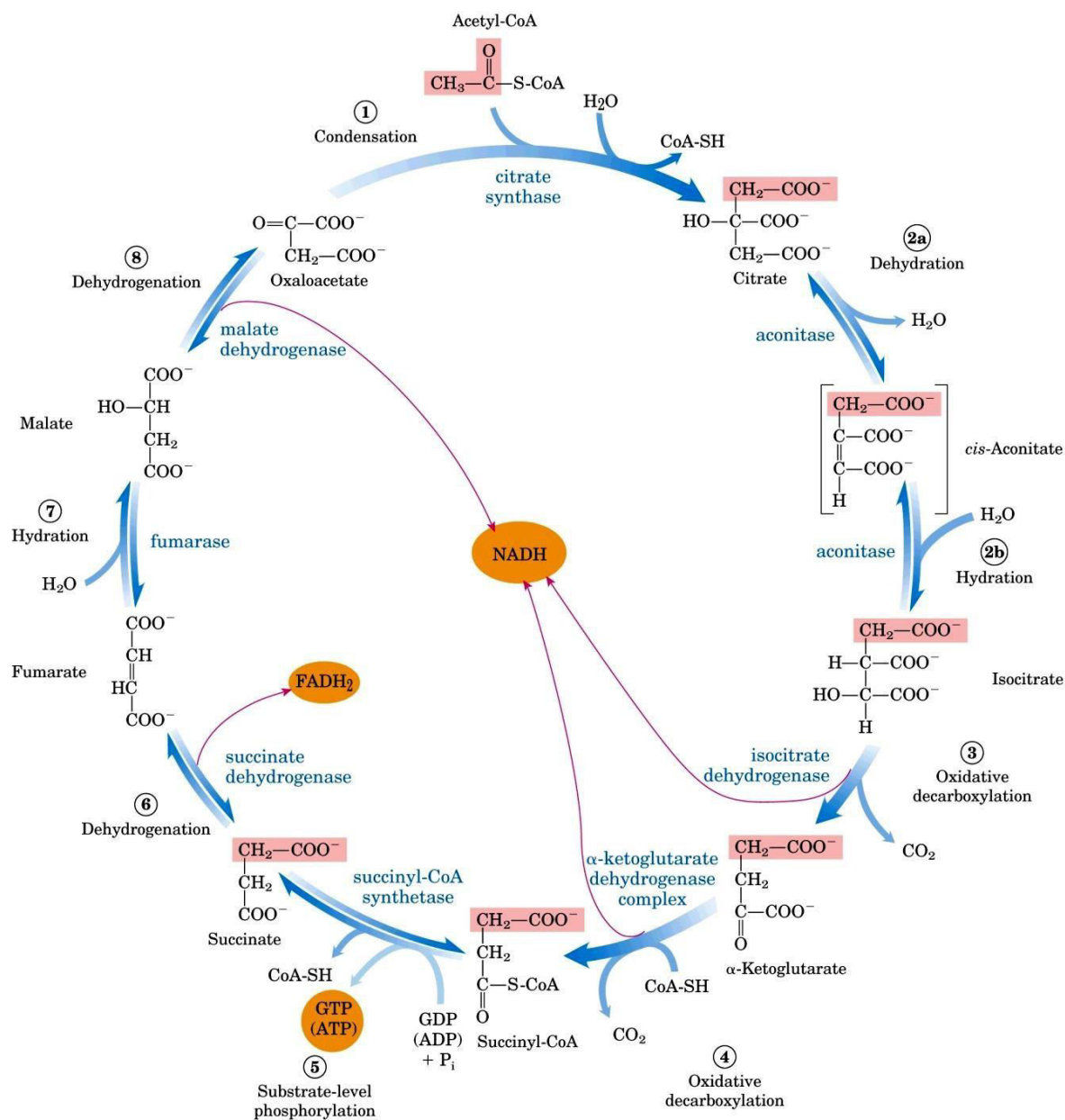


El NADH producido en esta reacción transfiere los electrones a la cadena respiratoria donde se unen a oxígeno para dar agua, en el proceso se obtienen 3 ATP desde ADP.

Mecanismo de reacción



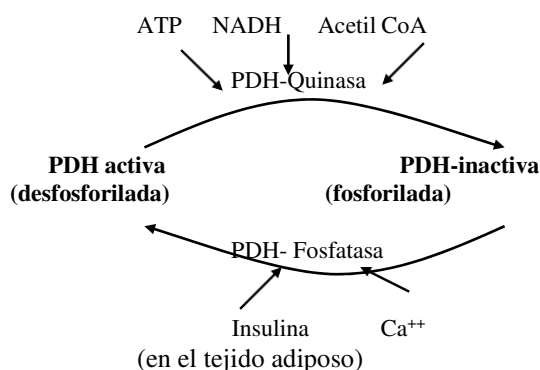
CICLO DE KREBS



Extraído de: LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4ª ed, 2008.

Regulación del Ciclo de Krebs

Indirectamente el ciclo de Krebs está controlado por el complejo de la Piruvato deshidrogenasa, el cual está regulado mediante fosforilación reversible, siendo inhibido por ATP, AcetilCoA y NADH y es estimulado por insulina y el Ca^{++} (este último aumenta en el ejercicio muscular intenso y estimula la fosfatasa).

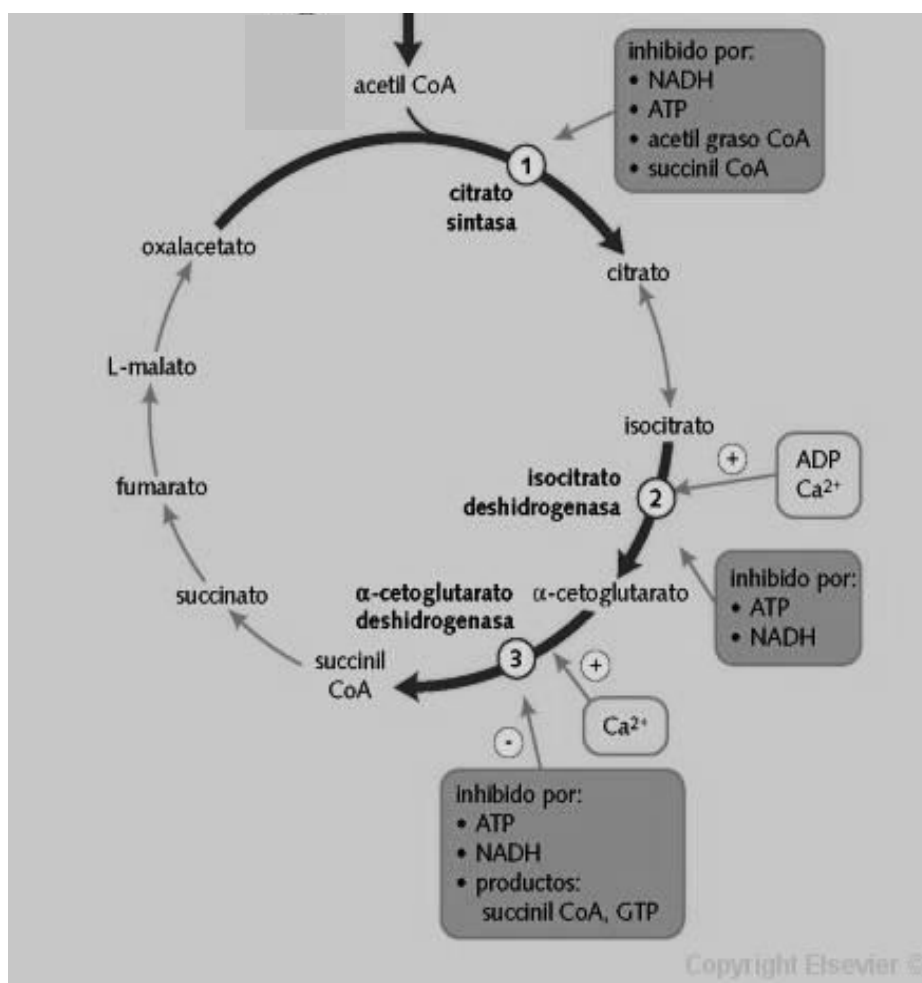


El ciclo propiamente dicho está regulado en tres puntos principales:

1º Punto de Control: A nivel de la *citrato sintasa* la cual es inhibida por el ATP y por NADH

2º Punto de Control: A nivel de la *Isocitrato deshidrogenasa*, esta enzima es estimulada alostéricamente por ADP y es inhibida por NADH y ATP.

3º Punto de Control: A nivel de la α -*cetoglutarato deshidrogenasa*, esta enzima está regulada de forma análoga al complejo piruvato deshidrogenasa.

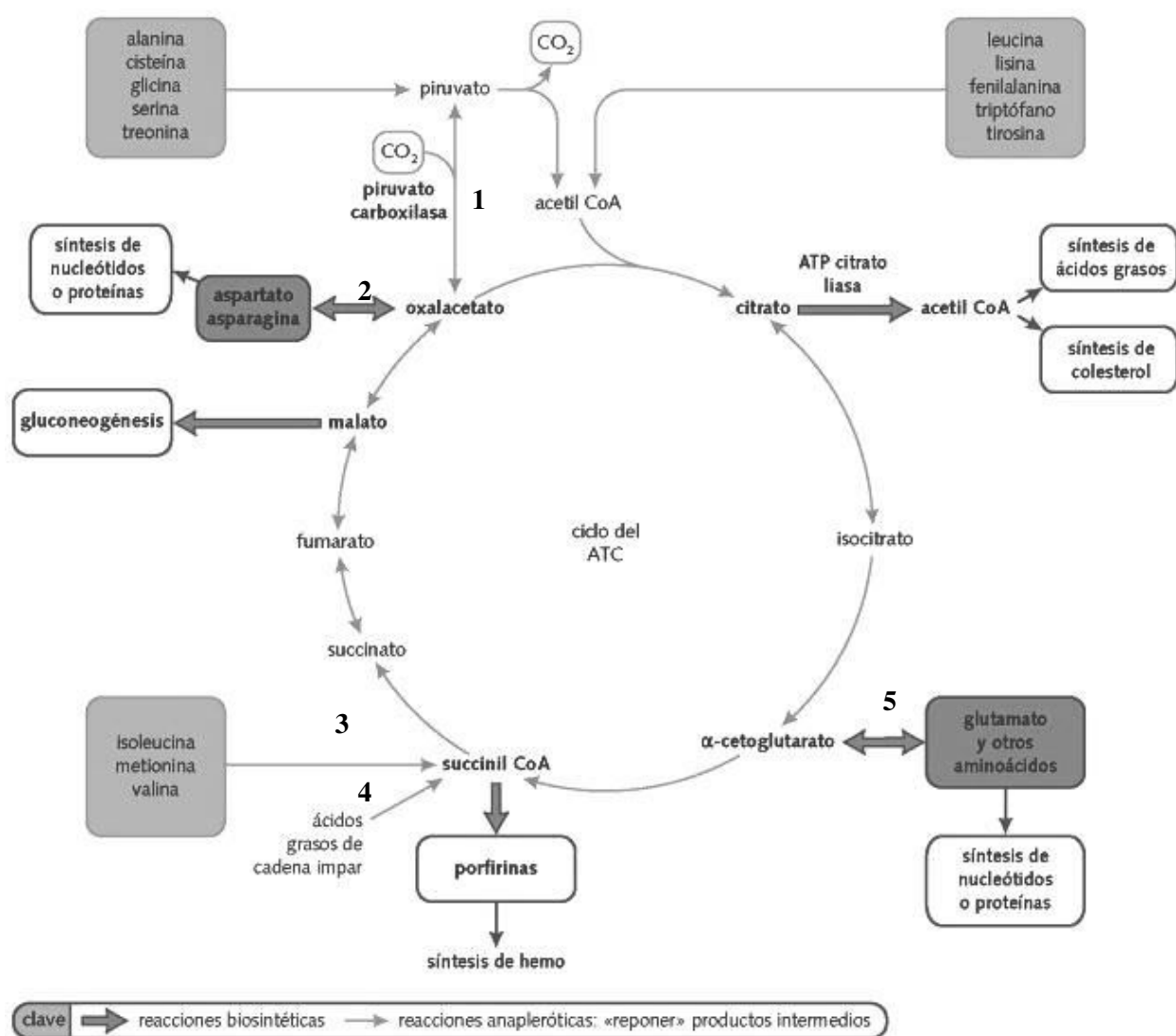


Extraído de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S. Harcourt Brace, 1998.

Función anaplerótica del Ciclo de Krebs

Varios de los intermediarios del Ciclo están relacionados con otras vías metabólicas, sirviendo de puntos de entrada de sustratos al Ciclo y asegurando una adecuada concentración de intermediarios. A su vez, estas relaciones metabólicas posibilitan el aporte de intermediarios del Ciclo de Krebs, que actúan como precursores en distintos procesos anabólicos. El Ciclo es, por lo tanto, una vía anfibólica.

Los intermediarios del ciclo de Krebs salen del mismo para actuar como precursores de muchas rutas biosintéticas, dando lugar a productos que en el esquema que sigue se indican con flecha doble. Con los números 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran 5 reacciones anapleróticas que reemplazan los intermediarios consumidos en el ciclo.



Extraído de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S. Harcourt Brace (1998)

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1) A varios medios de cultivos inoculados con levaduras se agregó glucosa en igual concentración. A los 3 minutos se determinó la glucosa por el método de la *glucosa oxidasa* y los resultados fueron aproximadamente de 0,8 g/l. Posteriormente se agregó a cada uno, en forma individual, las sustancias que se detallan en la columna A y a los 30 minutos se determinó glucosa obteniéndose los resultados indicados en la columna B.

Una con una flecha los datos de la columna B con la columna A según lo esperado para el consumo de azúcar en cada condición. En el tubo testigo la concentración de glucosa a los 30 minutos fue de 0,20 g/l.

COLUMNA A	COLUMNA B (Glucosa g/l)
1.- Nada (Testigo)	0,75
2.- AsO_4^{3-}	0,20
3.- NaF	0,20
4.- Citrato	0,75
5.- $\text{AsO}_4^{3-} + \text{PO}_4^{3-}$	0,75
6.- Iodoacetato	0,10

2) En dos tubos diferentes se incubaron extractos celulares de músculo de conejo (tubo A) y de levaduras (tubo B) con fosfato y glucosa marcada isotópicamente con ^{14}C en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica (NaN_3) a pH= 5 y 30° C. Las medidas de radiactividad, en alícuotas iguales de medio, antes de agregar las células (t=0) y luego de 1 hora de incubación se muestran en la siguiente tabla:

	% de radiactividad	
T (min)	Tubo A	Tubo B
0	100	100
60	99	65

- ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?
- Construya una tabla con los valores teóricos de % de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones pero con 1- ^{14}C glucosa.
- Igual que b) pero con 3- ^{14}C glucosa.

3) En la primera reacción de la glicólisis, la enzima hexoquinasa usa ATP para transferir un grupo fosfato a la glucosa y formar glucosa-6-fosfato. El producto continúa la glicólisis para ser oxidado a piruvato,

precursor del acetil-CoA que se oxidará en el ciclo del ácido cítrico. Suponer que una célula dispone sólo de glucosa para obtener energía y que la actividad hexoquinasa es de repente detenida en esta célula. ¿Cuál de las siguientes condiciones se producirá?

- a) La célula continuará produciendo energía mediante el transporte electrónico mitocondrial
- b) La célula continuará produciendo ATP mediante el ciclo del ácido cítrico
- c) La célula será finalmente incapaz de producir ATP
- d) La célula estará forzada a disparar la fermentación para producir ATP
- e) El consumo de oxígeno por la célula estará incrementado.

4) Señálese la posición del carbono isotópico en el ácido cítrico, cuando se incuban los siguientes compuestos marcados isotópicamente:

- f) 3-^{*}C –Piruvato b) 2-^{*}C- Piruvato c) 5-^{*}C- Fructosa-6-fosfato

5) ¿Cuál es el rendimiento en ATP cuando cada uno de los siguientes sustratos es oxidado completamente a CO₂ por un homogenato celular? Supóngase que la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa son completamente activos.

- a. Piruvato. b) Lactato. c) Fructosa-1,6 difosfato.

6) El oxalacetato mitocondrial es precursor de muchos aminoácidos. ¿Qué rol cumple el piruvato en el ciclo del ácido cítrico a medida que el oxalacetato es utilizado en la biosíntesis de aminoácidos? ¿Cómo se repone el oxalacetato en las células animales?

GUIA DE ESTUDIO

Metabolismo de carbohidratos- Digestión y Absorción

1- Difusión facilitada: entrada de glucosa a las células del tejido muscular, adiposo, hígado, eritrocitos, cerebro. Familia de transportadores de glucosa.

Vía glicolítica:

2- Reacciones, enzimas y cofactores de la fase preparatoria y de las etapas de óxido-reducción

3- Definición de la siguiente terminología: Glicólisis. Glucógeno-génesis. Glucógeno-lisis. Gluconeogénesis.

4- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glicolítica?

5- Acción de la hexoquinasa (isoenzimas I, II y III) y de la isoenzima IV: glucoquinasa Diferencia en la afinidad por la glucosa (valores de Km y Vm).

6- Estudio o análisis de cada una de las reacciones.

- 7- Acción de inhibidores: iodoacetato, fluoruro, arseniato.
- 8- De acuerdo a las necesidades metabólicas y energéticas de célula ¿Cuál es el destino de la glucosa-6-fosfato?
- 9- Producto final de la glicólisis anaeróbica en levaduras y músculo en contracción y en aerobiosis. Efecto Pasteur. Rendimiento energético.
- 10- Importancia de la regeneración de NAD en la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa . Lanzadera del glicerofosfato.
- 11- Balance energético de la glicólisis anaeróbica.
- 12- En que órgano se encuentra la enzima glucosa-6-fosfatasa y cuál es su función.

Regulación.

- 13- Describa las etapas fisiológicamente irreversibles. ¿Cuáles son las enzimas que regulan la velocidad de la vía? ¿Qué compuestos actúan como moduladores positivos y negativos?

Conversión de piruvato a acetil CoA

- 14- Enzimas y cofactores que intervienen en el complejo de la piruvato deshidrogenasa. Regulación. Irreversibilidad

Ciclo de Krebs

- 15- ¿En qué lugar de la célula se llevan a cabo las reacciones del Ciclo de Krebs? Procedencia de la acetil CoA.
- 16- Formular todas las reacciones del ciclo con nombre de las enzimas y coenzimas.
- 17- ¿Cuáles son las enzimas que regulan la velocidad del ciclo? Indicar sus moduladores.
- 18- Papel anfibólico del ciclo:
- a) ¿Qué intermediarios del ciclo pueden servir como precursores de otras vías metabólicas?
 - b) ¿Cómo se reponen los mismos?. Describir las principales reacciones anapleróticas.
- 19- Balance energético desde acetil CoA y desde piruvato.
- 20- Balance energético de la oxidación completa de una molécula de glucosa.

TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N°4

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. VÍA DE LAS PENTOSAS.

METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

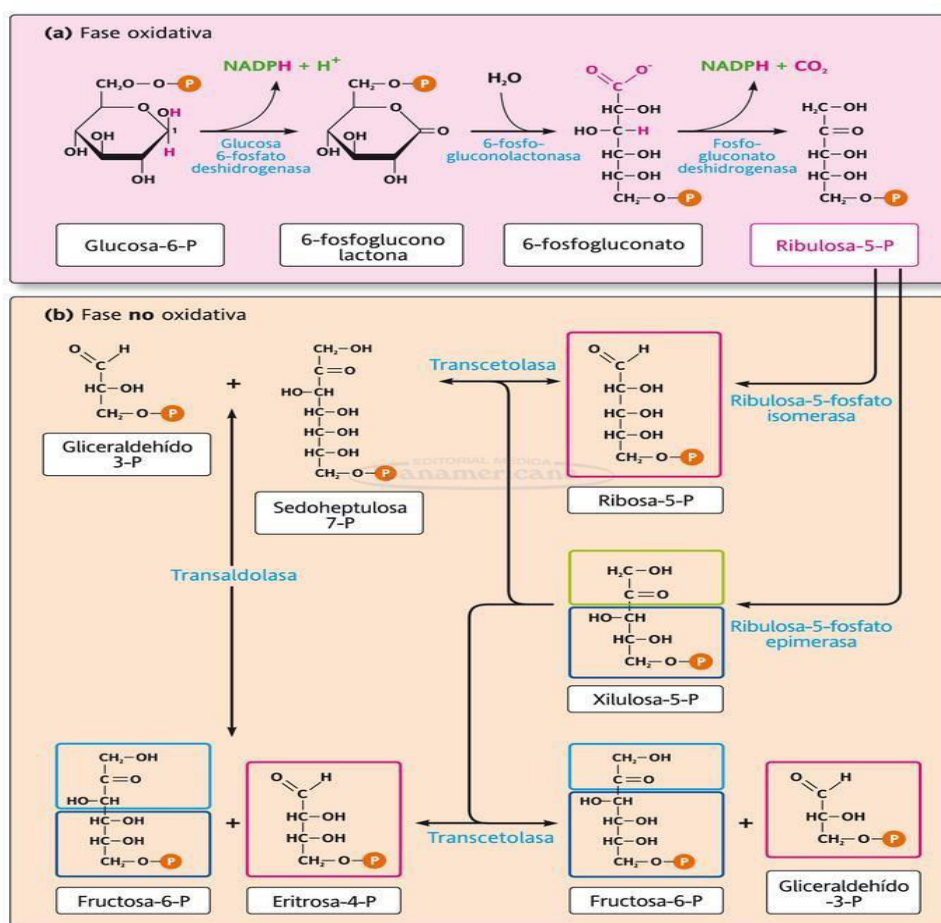
Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Describir la secuencia de reacciones que integran la vía de las pentosas, enzimas, destino de los productos (NADPH, Ribosa 5-fosfato), interrelaciones con la vía glicolítica.
- ✓ Formular las reacciones de degradación y síntesis de glucógeno, regulación y control hormonal.

Introducción. Vía de las pentosas

La **glucosa-6-fosfato** puede catabolizarse por una ruta alternativa, la **Vía de las Pentosas**. Dentro de los objetivos fundamentales de esta vía está la formación de **NADPH**, utilizado principalmente en la síntesis de ácidos grasos y esteroides, como así también la producción de **ribosa-5-fosfato**, necesaria para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Esta ruta posibilita también la **interconversión de varios carbohidratos de 3, 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono**, relacionándolos con la vía glicolítica.



Metabolismo del glucógeno.

En el hígado, el glucógeno sirve de depósito de glucosa. Por degradación del glucógeno se libera glucosa la cual pasa a la sangre para su distribución a otros tejidos. En el músculo, el glucógeno se degrada para proporcionar energía en forma de ATP para la contracción muscular.

a) Glucogenogénesis

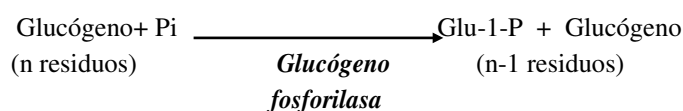
La formación de glucógeno a partir de glucosa se lleva a cabo, principalmente, en hígado y músculo. Es un proceso anabólico que requiere energía y está regulado principalmente por la enzima *glucógeno sintasa*.

b) Degradación del glucógeno o glucogenólisis

El glucógeno es una forma de almacenamiento de glucosa fácilmente movilizable a través del proceso denominado **glucogenólisis**. Es un proceso que utiliza enzimas diferentes a la vía anabólica siendo la enzima reguladora la *glucógeno fosforilasa*.

La glucogenólisis se lleva a cabo por la acción secuencial de dos enzimas, la *glucógeno-fosforilasa* y la *fosfoglucomutasa*, produciéndose primero la eliminación secuencial de residuos de glucosa-1-fosfato del extremo no reductor de la molécula de glucógeno, y luego la conversión a glucosa-6-fosfato por acción de la mutasa.

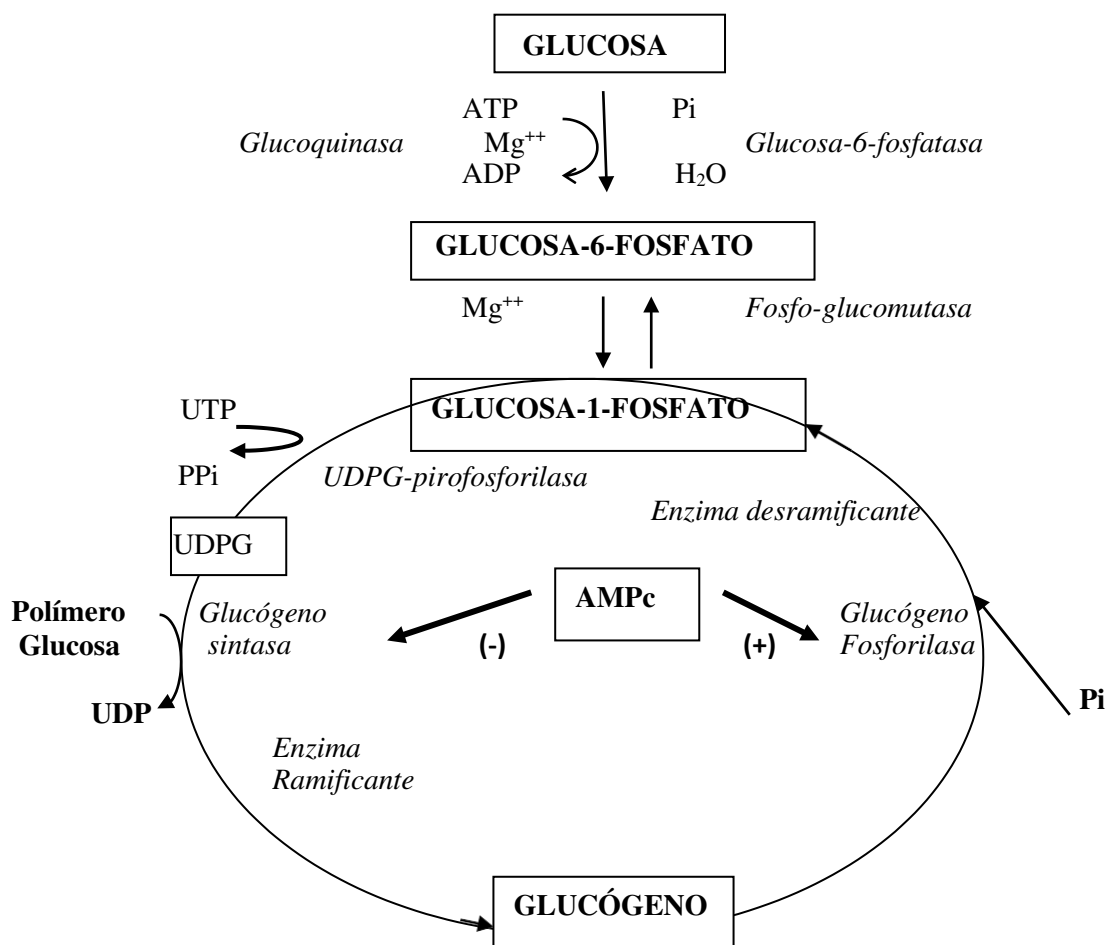
La Glucógeno fosforilasa, cataliza la reacción general:



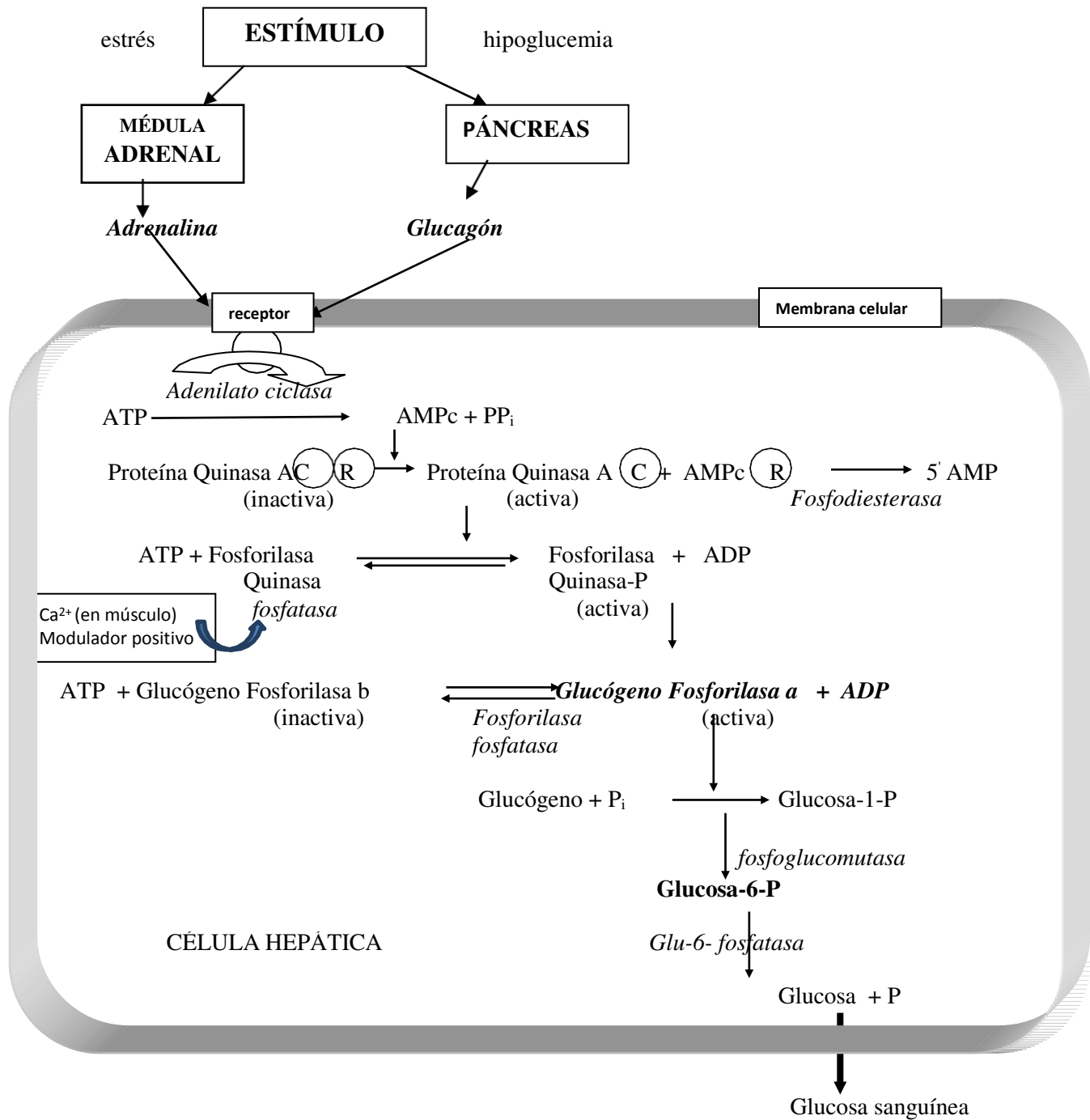
Esta enzima que se halla en el músculo e hígado, constituye en ejemplo importante de enzima reguladora, modulada por modificación covalente de la molécula de enzima e interconversión entre sus formas activa e inactiva.

La Glucosa-1P así formada puede degradarse hasta ácido láctico en el músculo o transformarse en glucosa libre en el hígado.

La *glucógeno sintasa* y la *glucógeno fosforilasa* están reguladas en forma recíproca por un ciclo de fosforilación-desfosforilación, cuando se estimula una enzima se inhibe la otra.



ESTIMULACIÓN HORMONAL DE LA DEGRADACIÓN DE GLUCOGENO



(C)(R) : Centro catalítico regulador

(C) : subunidad catalítica.

(R) : subunidad reguladora.

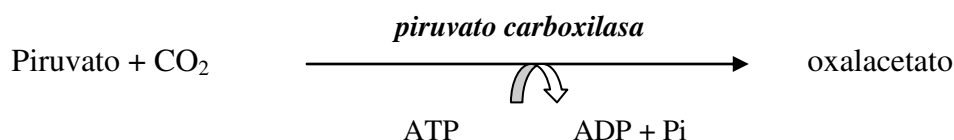
Gluconeogénesis

Es el proceso de biosíntesis de glucosa y glucógeno a partir de compuestos no glucídicos (por ejemplo alanina, aspartato, glicerol, etc). Esto permite obtener glucosa cuando en la dieta no se ofrecen suficientes carbohidratos y en situaciones como el ayuno, y algunas patologías como la diabetes no tratada, donde la célula no puede utilizar glucosa como fuente de energía.

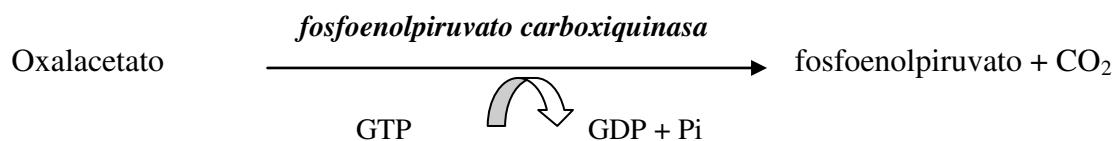
El requerimiento de glucosa es indispensable en algunos tejidos (sistema nervioso y glóbulos rojos) y ante las situaciones mencionadas previamente, la célula recurre a esta vía para proveer la glucosa necesaria.

En humanos, el hígado es el órgano principal donde se realiza el proceso, y es por lo tanto el que aporta la energía, ya que es un proceso costoso. Se realiza en dos compartimentos: citosol y matriz mitocondrial.

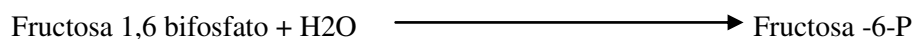
La gluconeogénesis no es simplemente el camino inverso de la glucólisis, pues las reacciones irreversibles, no permiten regresar por el camino inverso. Son necesarias otras reacciones o desvíos para saltar las reacciones irreversibles de la glucólisis y poder realizar el proceso. En la vía glicolítica, la reacción de piruvato quinasa es irreversible por lo tanto, la célula incorpora el piruvato a la matriz mitocondrial y lo transforma en oxalacetato mediante la reacción con **piruvato carboxilasa** que requiere ATP y biotina como cofactor, para introducir una molécula CO₂ y formar el carboxilo:



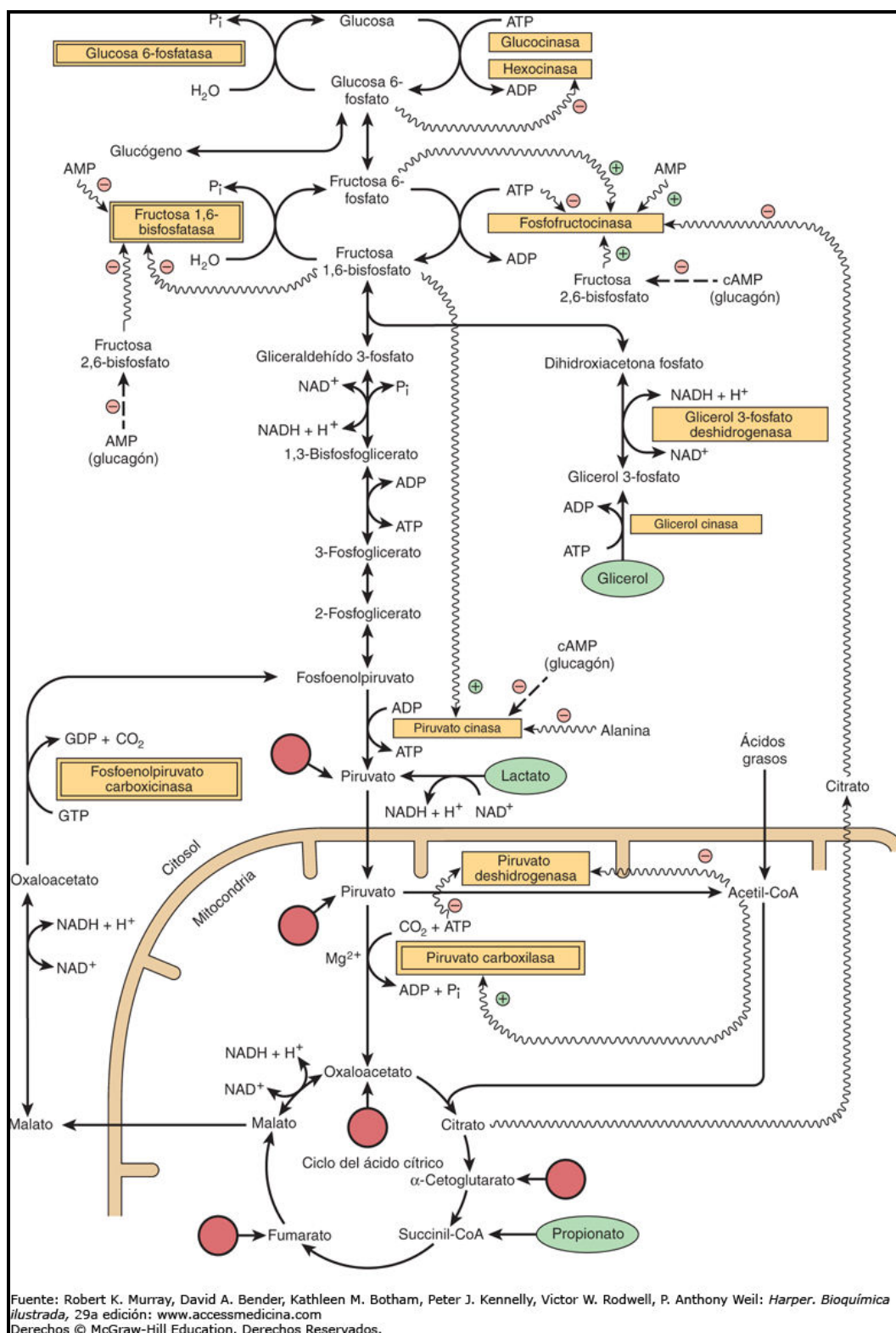
Luego el oxalacetato se reduce a malato, el cual atraviesa la membrana mitocondrial y en el citosol se oxida nuevamente a oxalacetato, en ambos casos con la enzima malato deshidrogenasa. Posteriormente mediante una reacción de desvío que utiliza como enzima **fosfoenolpiruvato carboxiquinasa**, el oxalacetato se convierte en fosfoenolpiruvato y así se incorpora nuevamente a la vía.



Para poder llegar a glucosa, son necesarias también dos **fosfatasas** para revertir las reacciones.



El conjunto de reacciones lo podemos ver en la siguiente figura y el proceso es irreversible.



Costo energético

- A partir de piruvato



- A partir de glicerol



PROBLEMAS DE APLICACIÓN

- 1) Si se administra al tejido adiposo glucosa radioactiva marcada únicamente en C1, se forma ácido láctico con muy poca radiactividad, en cambio administrando la misma glucosa al tejido muscular, aparece ácido láctico marcado en C3. Razonar esta diferencia experimental.
- 2) Se incubó glucosa-6-fosfato marcada con ^{14}C en C₆ con una suspensión de eritrocitos en presencia de un potente inhibidor de la fosfoglucoisomerasa. Al cabo de un tiempo se detectó la presencia de piruvato ^{14}C . Esquematice las reacciones que llevan a la producción del mismo señalizando el carbono marcado.
- 3) Se aislaron eritrocitos de la sangre de un individuo normal y de un paciente con deficiencia de tiamina. Las células fueron incubadas con buffer conteniendo 1- ^{14}C -glucosa y se determinaron las cantidades de $^{14}\text{CO}_2$ y ^{14}C -láctico formados al cabo de 1 hora. Analice los resultados obtenidos que se indican en la tabla y justifique la disminución de CO_2 para el individuo deficiente.

Productos	% de ^{14}C en productos	
	Individuo Normal	Individuo Deficiente
CO_2	10,4	1,7
Láctico	80,0	98,0

- 4) El valor de $V_{\text{máx}}$ para la enzima fosforilasa del glucógeno del músculo esquelético es mucho mayor que el valor de $V_{\text{máx}}$ de la misma enzima del tejido hepático.

a) ¿Cuál es la función fisiológica de la glucógeno fosforilasa del músculo esquelético y del tejido hepático?

b) ¿Porqué debe ser mayor la $V_{\text{máx.}}$ de la enzima muscular que la de la enzima hepática?

5) Las unidades glucosilo del glucógeno hepático originan fácilmente glucosa libre en sangre, en cambio los glucosilos del glucógeno muscular, no aportan glucosa a la sangre. Indicar cuál será la diferencia enzimática entre ambos tejidos que explique satisfactoriamente esta diferencia de comportamiento.

6) Entre las enzimas gluconeogénicas se encuentran todas las siguientes EXCEPTO:

- a) fructosa 1,6 bisfosfatasa.
- b) glucosa-6-fosfatasa.
- c) fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.
- d) fosfoglucomutasa.
- e) piruvato carboxilasa.

6) Indique y explique cuanto ATP se consume para la síntesis de glucosa por gluconeogénesis, a partir de:

- a) Alanina.
- b) Glicerol.

Integración de las vías metabólicas

En base a los siguientes criterios clave complete el cuadro con las vías indicadas, así logrará tener una visión en conjunto de cada una de ellas.

	GLICÓLISIS	GLUCOGENOLISIS	GLUCOGENOGENESIS	CICLO DE KREBS	VIA DE LAS PENTOSAS
Criterios claves Cuál es la función de la vía. Indique el sustrato, el producto y otros compuestos de interés.					
Localización En particular tejidos o células del organismo					
Compartmentalización Lugar del proceso en el interior de la célula.					
Etapas globales de la vía y principales puntos de control.					
Mencione la relación con otras vías metabólicas.					

GUÍA DE ESTUDIOS. Vía de las Pentosas

- 1- Reacciones, enzimas y cofactores.
- 2- ¿Cuál es el mecanismo de acción de la transaldolasa y transcetolasa? ¿En qué reacciones actúan estas enzimas?
- 3-¿Cuáles son las enzimas de la parte oxidativa de la vía?
- 4- ¿En que reacciones se produce NADPH? ¿Qué vías metabólicas lo pueden utilizar?
- 5- ¿Qué reacciones catalizan las enzimas epimerasa y isomerasa?
- 6- ¿Qué enzima necesita como cofactor el pirofosfato de tiamina?
- 7- En la reacción de oxidación de glucosa-6-fosfato ¿Cuáles son los productos de reacción?
- 8- ¿Qué intermediarios de la vía glicolítica se producen en esta vía?
- 9- En qué órganos y tejidos es más activa esta vía?

METABOLISMO DE GLUCOGENO**Glucogenólisis:**

10- Degradación de glucógeno en el hepatocito:

- a) Cómo actúa la glucógeno fosforilasa y cuáles son los productos de la reacción?
- b) Qué enzima actúa sobre las uniones α 1,6 glucosídicas de los puntos de ramificación.
- c) ¿Cuál es la enzima que da como producto glucosa-6-fosfato?
- d) ¿Qué enzima es activada en presencia de adrenalina y qué efecto tiene el producto de la reacción que cataliza?
- e) ¿Qué acción tiene sobre la glucógenolisis a nivel del hepatocito un aumento de la concentración de glucagón en sangre?
- f) ¿Qué reacción cataliza y en qué órgano se encuentra la glucosa 6-fosfato fosfatasa?

Glucogenogénesis:

11- Reacciones que participan en la síntesis de glucógeno.

12- Regulación hormonal

TRABAJO PRÁCTICO AULA N° 5
METABOLISMO DE LÍPIDOS: LIPOPROTEÍNAS.
DEGRADACIÓN Y BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Describir las propiedades y composición de las lipoproteínas.
- ✓ Comprender los procesos de biosíntesis y degradación de ácidos grasos, los mecanismos regulatorios, cofactores necesarios, compartimentalización celular, requerimientos y rendimientos energéticos.

Introducción

Los lípidos deben ser transportados, a través del plasma sanguíneo, de un tejido a otro. El plasma, es un sistema acuoso ideal para transportar sustancias solubles en agua, como glucosa y aminoácidos. Sin embargo, los lípidos no son solubles en agua. Para superar este problema, los organismos utilizan diversos mecanismos mediante los cuales los lípidos son transportados por el plasma como **complejos macromoleculares**.

El sistema más simple es el de los ácidos grasos de cadena corta que se transportan unidos a la albúmina. La otra forma de transporte es el de las **lipoproteínas plasmáticas** que son grandes complejos formados por lípidos y proteínas específicas. Poseen una estructura de micela, con lípidos no polares (colesterol esterificado y triglicéridos) en un centro hidrofóbico rodeado por lípidos anfipáticos (fosfolípidos, colesterol libre) y proteínas (apoproteínas).

Propiedades y composición de las lipoproteínas plasmáticas				
Lipoproteína	Densidad (g/ml)	Lípidos principales	Movilidad electroforética.	Apoproteína.
QM	< 0,94	TG exógenos	0	B-48, A-1, IV
VLDL	0,94 a 1,006	TG endógenos	Pre-β	B-100, E, C-I, II, III
IDL	1,006 a 1,019	TG y CE	β	B-100, E
LDL	1,019 a 1,063	CE	β	B-100
HDL	1,063 a 1,21	FC, C, CE	α	A-I, II; CII, D y E

TG: Triglicéridos **CE:** Colesterol esterificado **FC:** Fosfatidilcolina **C:** Colesterol

Funciones de las lipoproteínas		
Tipo	Origen	Función fisiológica
Quilomicrones	Intestino	Transporte de triglicéridos de la dieta.
Residuos de Quilomicrones	Plasma	Liberación de lípidos de la alimentación en el hígado.
VLDL	Hígado	Transporte de los triglicéridos desde el hígado a otros tejidos.
IDL	Plasma	Primer producto formado por el catabolismo de las VLDL.
LDL	Plasma	Producto final del catabolismo de las VLDL ricas en colesterol esterificado.
HDL	Hígado, intestino	Eliminación del exceso de colesterol de tejidos y LP

Degradación de ácidos grasos

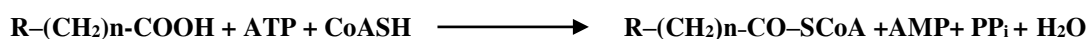
En mamíferos, el centro principal de acumulación de triglicéridos es el citoplasma de las células adiposas (adipocitos). El primer paso en la utilización de las grasas como fuente de energía es la hidrólisis de los triglicéridos por acción de lipasas reguladas por hormonas.

Luego los **ácidos grasos libres** se degradan en las mitocondrias de las células (hígado y tejidos extrahepáticos) por eliminación secuencial, a partir del **extremo carboxílico**, de unidades de dos carbonos (**Acetil-CoA**), conocida como vía de **β -oxidación**.

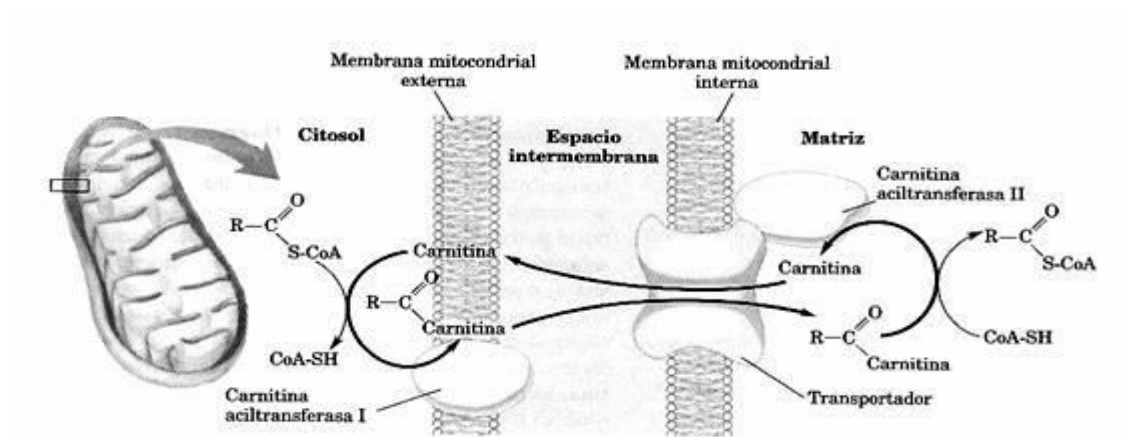
Previamente los ácidos grasos se activan en el **citósol** y son transportados a través de la **membrana mitocondrial interna** conjugados con **carnitina** hasta la **matriz mitocondrial** donde se produce la oxidación. El sistema comprende dos enzimas: la *carnitina aciltransferasa I y II*.

Reacción de activación

Acil-CoA sintetasa o tioquinasa

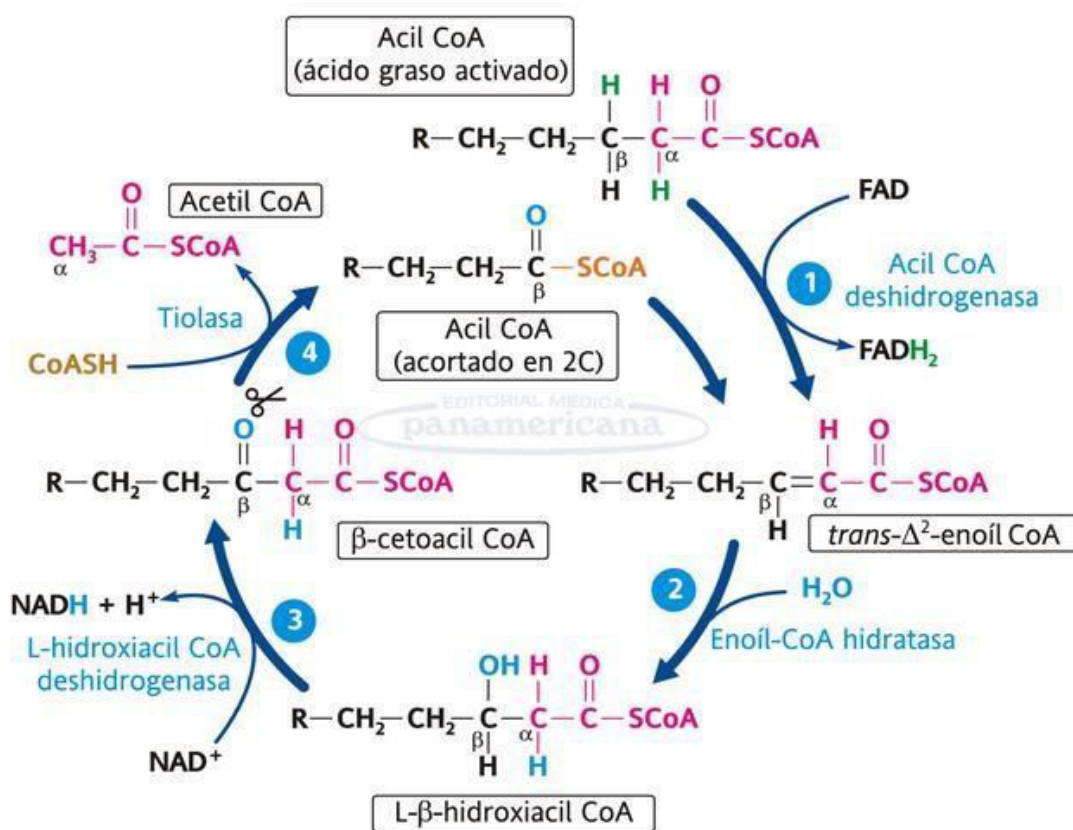


Mediante la siguiente representación podemos esquematizar dicho sistema de transporte:



Extraído de: LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica, Ed. Omega, 4° ed., 2008.

OXIDACION DE ACIDOS GRASOS SATURADOS



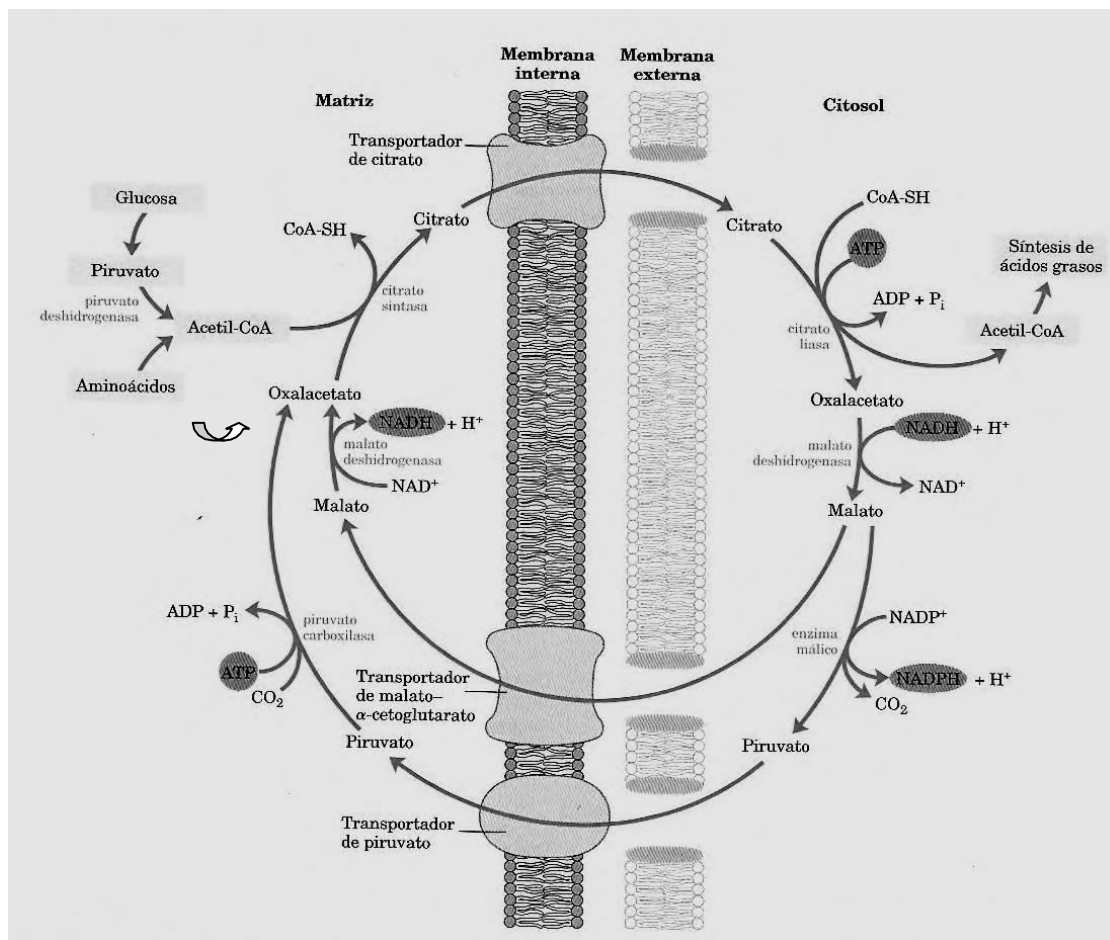
Extraído de "BIOQUIMICA. Conceptos esenciales." Feduchi, Blasco, Romero, Yañez. Editorial Panamericana 1° Ed.2010

Biosíntesis de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos se produce en el citosol y sus intermediarios están unidos a una proteína transportadora de acilos (ACP).

El sistema enzimático que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, a partir de Acetil-CoA, Malonil-CoA y NADPH se denomina **Ácido Graso Sintasa (AGS)**.

El citrato transporta grupos acetilo desde la mitocondria al citosol para la síntesis de ácidos grasos.



Extraído de: LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4º ed., 2008.

A continuación se enumeran las reacciones que conducen a la síntesis de palmitato en los organismos superiores y bacterias.

Etapas	Reacción	Enzimas
1-	$\text{Acetil-CoA} + \text{HCO}_3^- + \text{ATP} \longrightarrow \text{Malonil-CoA} + \text{ADP} + \text{Pi} + \text{H}^+$	Acetil-CoA carboxilasa
2-	$\text{Acetil-CoA} + \text{HS-EC} \longrightarrow \text{Acetil-EC} + \text{CoA}$	Acetil transferasa
3-	$\text{Malonil-CoA} + \text{ACP} \longrightarrow \text{Malonil-ACP} + \text{CoA}$	Malonil transferasa
4-	$\text{Acetil-EC} + \text{Malonil-ACP} \longrightarrow \text{Acetoacetyl-ACP} + \text{HS-EC} + \text{CO}_2$	Enzima condensante
5-	$\text{Acetoacetyl-ACP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{D-3-OH-butiril-ACP} + \text{NADP}^+$	β -Cetoacil-reductasa

6-D-3-OH-butilil-ACP

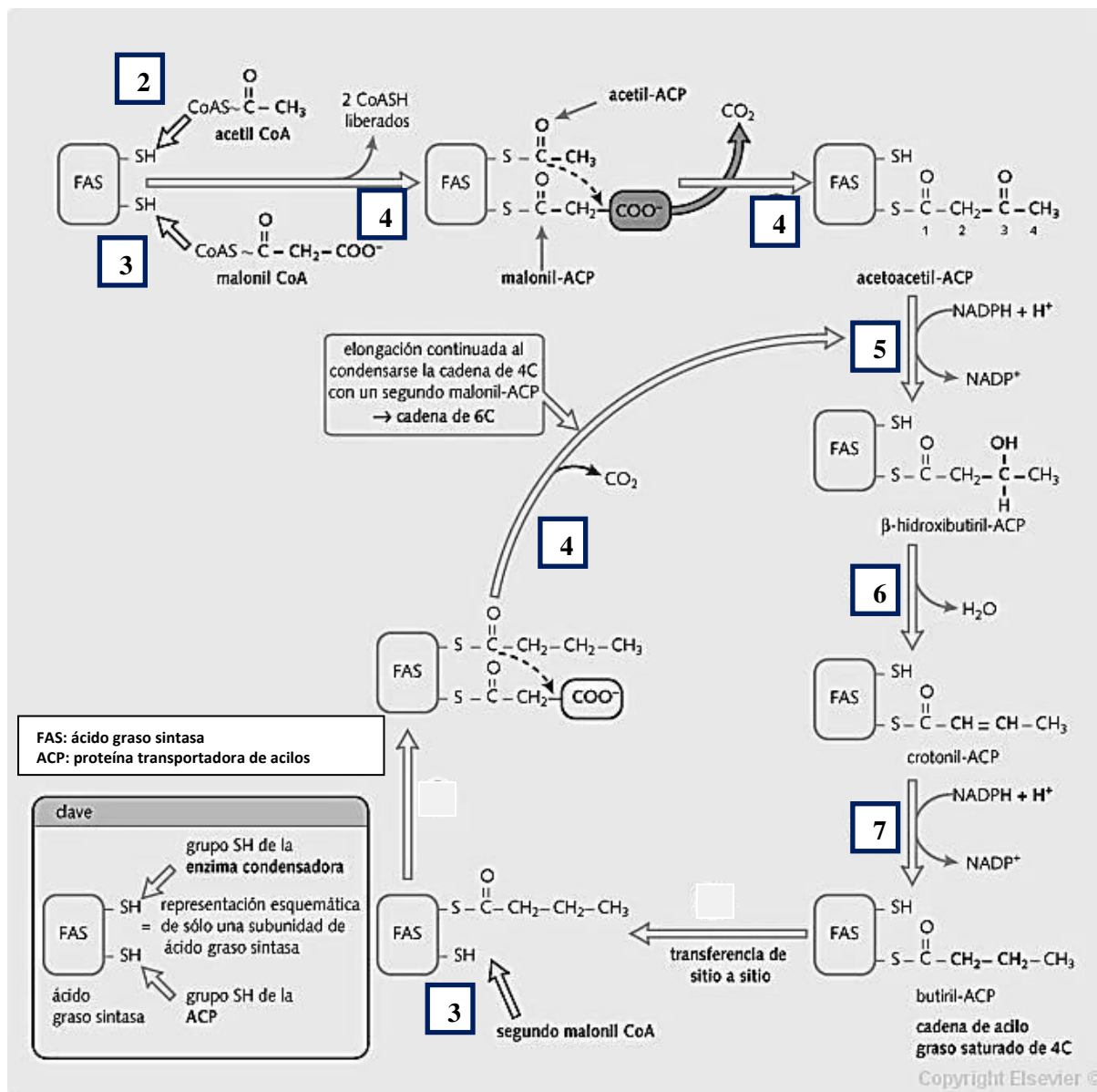
 Δ^2 butenil-ACP + H₂O

3-OH-acil deshidratasa

7- Δ^2 butenil-ACP + NADPH + H⁺Butiril-ACP + NADP⁺

Enoil-ACP reductasa

A continuación se representa el mecanismo de las reacciones



Extraído de "Metabolismo y nutrición". Benyon, S. Harcourt Brace (1998)

Esta secuencia de reacciones conduce a la formación de butiril-ACP, lo cual completa el primer ciclo de elongación.

En el segundo ciclo el Butiril es transferido desde la ACP a la enzima condensante (EC) formándose Butiril-EC, éste se condensa con otra molécula de malonil-ACP y se repite el ciclo para

formar un hexil-ACP. Los ciclos de elongación continúan hasta llegar a palmitoil-ACP, el cual se hidroliza por una esterasa para producir palmitato y ACP.

Comparación de la síntesis y degradación de los ácidos grasos

	Síntesis	Degradación
Cuando es activa	Tras comidas, situación post-prandial	Ayuno y ejercicio prolongado
Principales tejidos implicados	Hígado y tejido adiposo	Músculo e hígado
Compartamentización celular	Citosol	Mitocondria
Donante/ productor de 2C	Acetil-CoA y Malonil-CoA	Acetil-CoA
Transportador de Ácido Graso activo	Unido a ACP	Unido a CoA
Enzimas	Complejo multienzimático Ácido Graso sintasa	Probablemente no asociadas.
Oxidante / reductor	NADPH	NAD ⁺ y FAD
Control alostérico	El citrato activa la acetil-CoA carboxilasa, el palmitoil-CoA la inhibe.	Malonil-CoA inhibe la carnitina-acil-transferasa I
Control hormonal	La insulina activa la acetil-CoA carboxilasa, la adrenalina y el glucagón la inhiben.	La adrenalina y el glucagón activan la lipasa, la insulina la inhibe
Producto	Palmitato.	Acetil CoA

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

A) Lipoproteínas

1) La Lp (a) se ha convertido en el objeto de numerosas investigaciones. Indique su estructura y que parte de la molécula es la responsable de las propiedades metabólicas y patológicas de la Lp (a).

B) Degradación de Ácidos Grasos

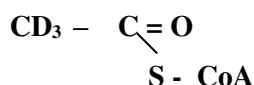
- 2) Se oxida palmitato (9 ¹⁴C) en condiciones de funcionamiento del Ciclo de Ácido Cítrico, ¿cuál será la localización del ¹⁴C en los siguientes compuestos?
- Acetil-CoA.
 - Citrato. Considérese tan solo una vuelta al Ciclo de Krebs.
 - Butiril-CoA.
- 3) ¿ Cuántas veces se debe repetir la secuencia de oxidación de Ácidos Grasos para oxidar el Ácido esteárico (18 C) completamente hasta Acetil-CoA y cuántos ATP se generan teniendo en cuenta la activación?

- 4) El palmitato libre se activa a su forma de derivado de CoA (palmitil CoA) en el citosol antes de poder ser oxidado en la mitocondria. Si se añade palmitato y CoA marcado con ^{14}C a un homogenado de hígado (con mitocondrias intactas), el palmitil CoA aislado de la fracción citosólica es radiactivo, mientras que el aislado de la mitocondria no lo es. ¿Por qué?

C) Biosíntesis de Ácidos grasos

- 5) Suponiendo que se incuba homogenato de tejido que posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y también NADPH, ATP, CO_3H^- y $2\text{-}^{14}\text{C}$ piruvato ¿Cuáles serán los átomos de carbono que resultarán marcados en el ácido palmítico?
- 6) Si sólo se marcara con ^{14}C la primera de las ocho moléculas de Acetil-CoA que se requieren en la biosíntesis del ácido palmítico, ¿cuál representaría la localización de la marca en el ácido palmítico?
- 7) Cuántas moléculas de glucosa se convierten en ribulosa-5P cuando una molécula de ácido palmítico se sintetiza a partir de acetil-CoA?. Considere que los carbonos del oxalacetato producido por el clivaje del citrato, regresan a la mitocondria a través de malato y no por el piruvato que podría obtenerse por acción de la enzima málica.
- 8) Considérese una preparación que contiene todas las enzimas y los cofactores necesarios para la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de acetil CoA y malonil CoA que se han añadido.

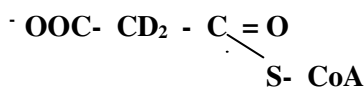
a) Si la acetil CoA marcada con deuterio (isótopo pesado del hidrógeno) y un exceso de malonil CoA se añaden como sustrato.



¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato ?

¿Cuáles son sus localizaciones?. Explicar.

- a) Si se añaden como sustratos acetil CoA sin marcar y malonil CoA marcada con deuterio



¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?

¿Cuáles serán sus localizaciones? Explicar.

GUIA DE ESTUDIO**Lipoproteínas**

- 1- ¿Cuál es la composición lipídica de cada una de las lipoproteínas? Principal lípido que transporta.
- 2- ¿Cuál es la función de las apoproteínas?
- 3- Con respecto a la enzima lipoproteinlipasa ¿Dónde se encuentra? ¿Cómo es activada? ¿Cuál es la acción de ésta enzima?
- 4- ¿En dónde se sintetizan y cómo son metabolizadas las HDL, VLDL, LDL y los quilomicrones?
- 5- ¿Cómo se internalizan las LDL en las células? Características de los receptores B/E y de macrófagos.
- 6- ¿Cómo se degradan las LDL cuando ingresan a las células?
- 7- ¿Qué función cumplen las HDL y las LDL?
- 8- ¿Qué apoproteína activa la LCAT y cómo actúa esta enzima?
- 9- ¿Cuál es el precursor de la síntesis del colesterol? Regulación de la misma. Eliminación del colesterol del organismo.

Degradación de ácidos grasos

- 10- ¿Cómo actúa la *lipasa hormona sensible* sobre los triglicéridos del tejido adiposo y cuáles son las hormonas que la regulan? ¿En qué condiciones metabólicas ocurre esta situación?
- 11- ¿Cómo circulan los ácidos grasos liberados por la *Lipasa hormona sensible* en el plasma?
- 12- Localización celular de la activación de los ácidos grasos, enzimas que intervienen en el proceso de activación de un ácido graso. Formular la reacción. Gasto energético.
- 13- ¿Cómo se transporta el ácido graso desde el citosol a la matriz mitocondrial?
- 14- Formular la secuencia de reacciones de la degradación de palmitoil-CoA, mencionando las enzimas y coenzimas que intervienen en este proceso de β oxidación. Cómo se regula el proceso? ¿Hay producción de agua durante la beta oxidación?
- 15- ¿Cuáles son los productos de la degradación de un ácido graso de número impar de átomos de carbono?
- 16- ¿Cuántos ATP y cuántas moléculas de Acetil-CoA se producen por degradación de un ácido graso de 16 átomos de carbono hasta acetil-CoA? Idem hasta CO_2 y H_2O ?
- 17- ¿En qué procesos metabólicos pueden utilizarse la acetil CoA proveniente de la degradación de los ácidos grasos?
- 18- ¿Cuáles son los “cuerpos cetónicos” y donde se producen. ¿En qué situaciones metabólicas aumentan? ¿Cómo se degradan?

Biosíntesis de ácidos grasos

- 19- ¿En qué lugar de la célula ocurre la biosíntesis de los ácidos grasos?

- 20-¿Cuál es el intermediario del Ciclo de Krebs que transporta los grupos acetatos desde la mitocondria al citosol?
- 21-¿Cómo se denomina el complejo que cataliza la biosíntesis de ácidos grasos saturados?
- 22-¿Cuáles son los precursores de la síntesis de ácidos grasos?
- 23-Formular las etapas de la síntesis de ácidos grasos indicando las enzimas correspondientes.
- 24-¿Cuál es la etapa limitante de la velocidad de reacción y cuáles son los moduladores de la enzima?
- 25-¿Cuántas moléculas de NADPH y ATP se requieren para sintetizar palmitil-ACP?
- 26-¿De dónde proviene el NADPH?

TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y NUCLEÓTIDOS

Objetivos

Que el alumno logre:

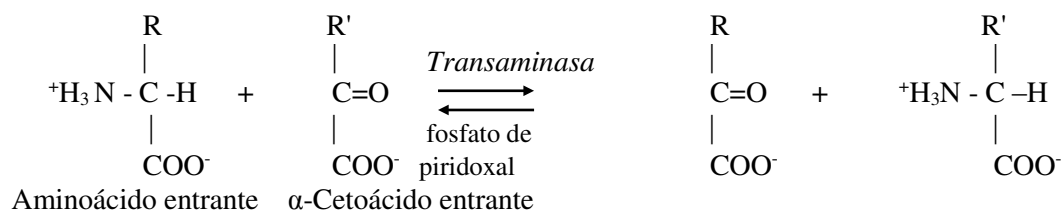
- ✓ Conocer los mecanismos de degradación de aminoácidos: transaminación, desaminación oxidativa, destino del grupo amino y de los esqueletos carbonados.
- ✓ Comprender la vía de eliminación del amoníaco a través del ciclo de la urea, las reacciones y enzimas involucradas, regulación, origen de los precursores, localización intracelular, balance energético.
- ✓ Formular las vías de síntesis de nucleótidos púricos y pirimídicos.
- ✓ Describir los mecanismos de regulación, requerimientos energéticos, vías de recuperación.
- ✓ Comprender los mecanismos de degradación de nucleótidos púricos y pirimídicos, enzimas, regulación, productos de degradación.

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS (PARTE A)

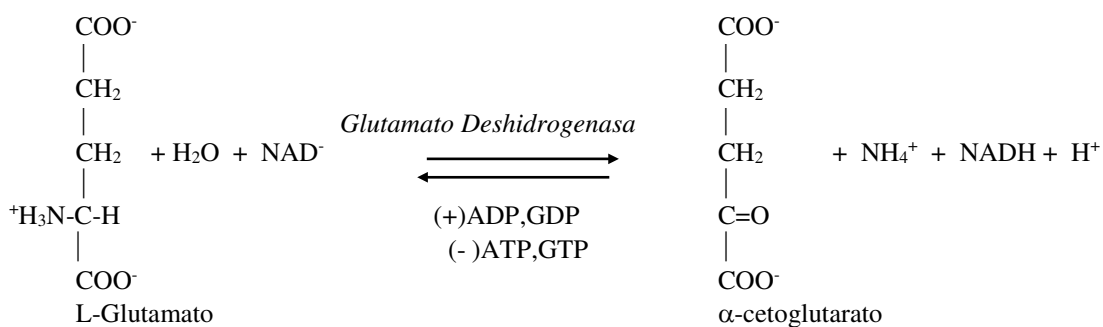
Introducción

Los aminoácidos experimentan la pérdida de sus grupos amino por dos rutas principales: transaminación y desaminación oxidativa. Sus esqueletos carbonados residuales pueden convertirse en glucosa u oxidarse a CO₂ a través del Ciclo de Krebs.

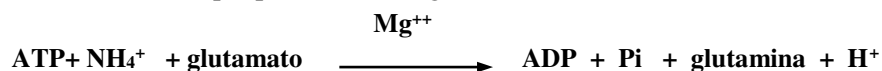
Transaminación. La ecuación general puede representarse así:



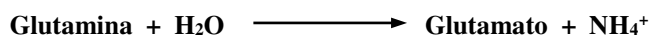
Desaminación oxidativa



El amoníaco es transportado desde los tejidos periféricos al hígado o los riñones en forma de un compuesto no tóxico, glutamina. La síntesis de glutamina tiene lugar por acción de la enzima **glutamina sintetasa** que promueve la siguiente reacción:



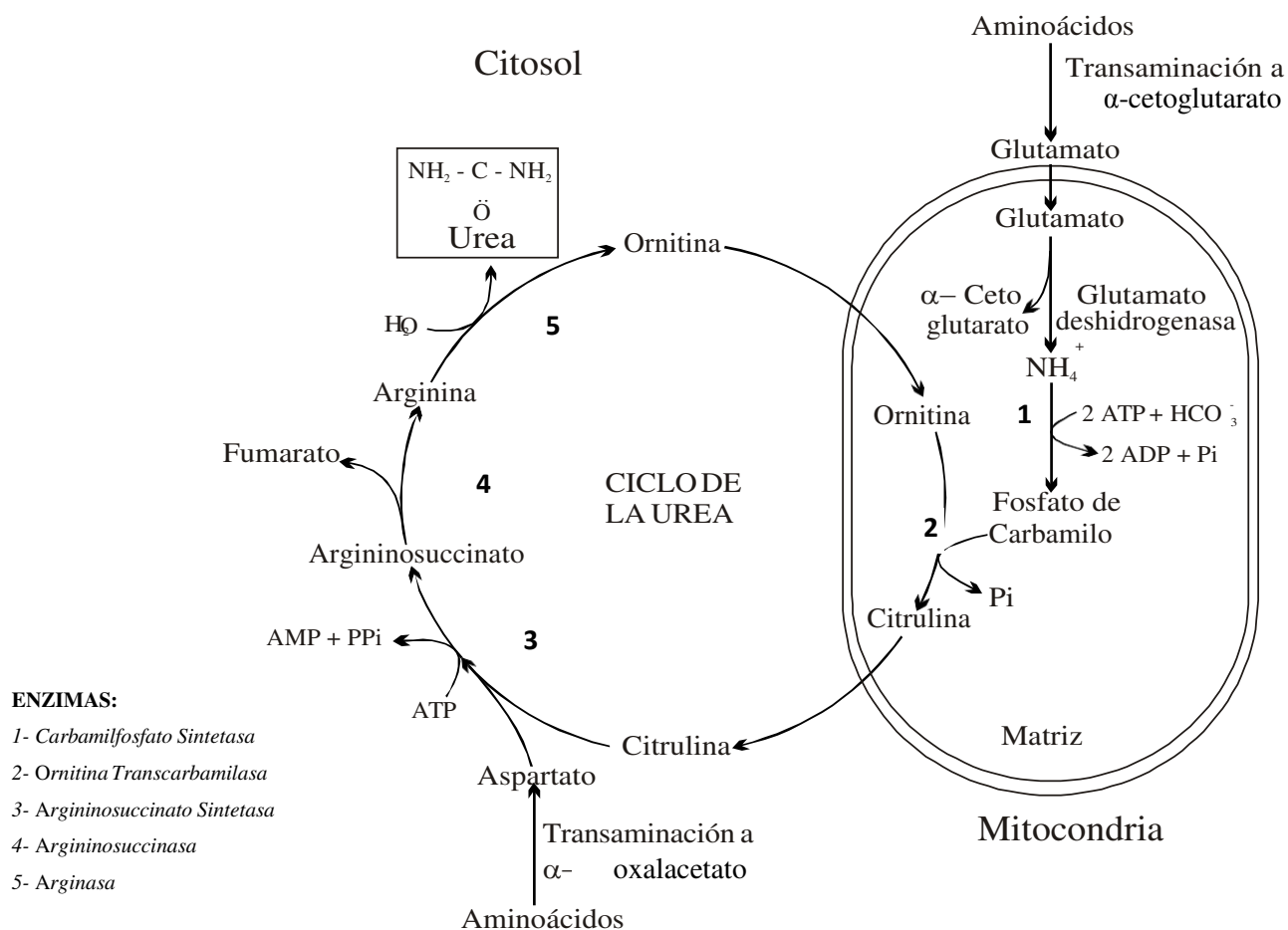
La glutamina es transportada por vía sanguínea hasta el hígado en la mayor parte de los animales en donde se transforma en glutamato y amoníaco por acción de la **glutaminasa**. Esta enzima también se encuentra en los túbulos renales.



En la mayoría de los vertebrados terrestres el NH_4^+ se convierte en urea en el hígado, y en menor proporción en riñón, y luego ésta es excretada con la orina.

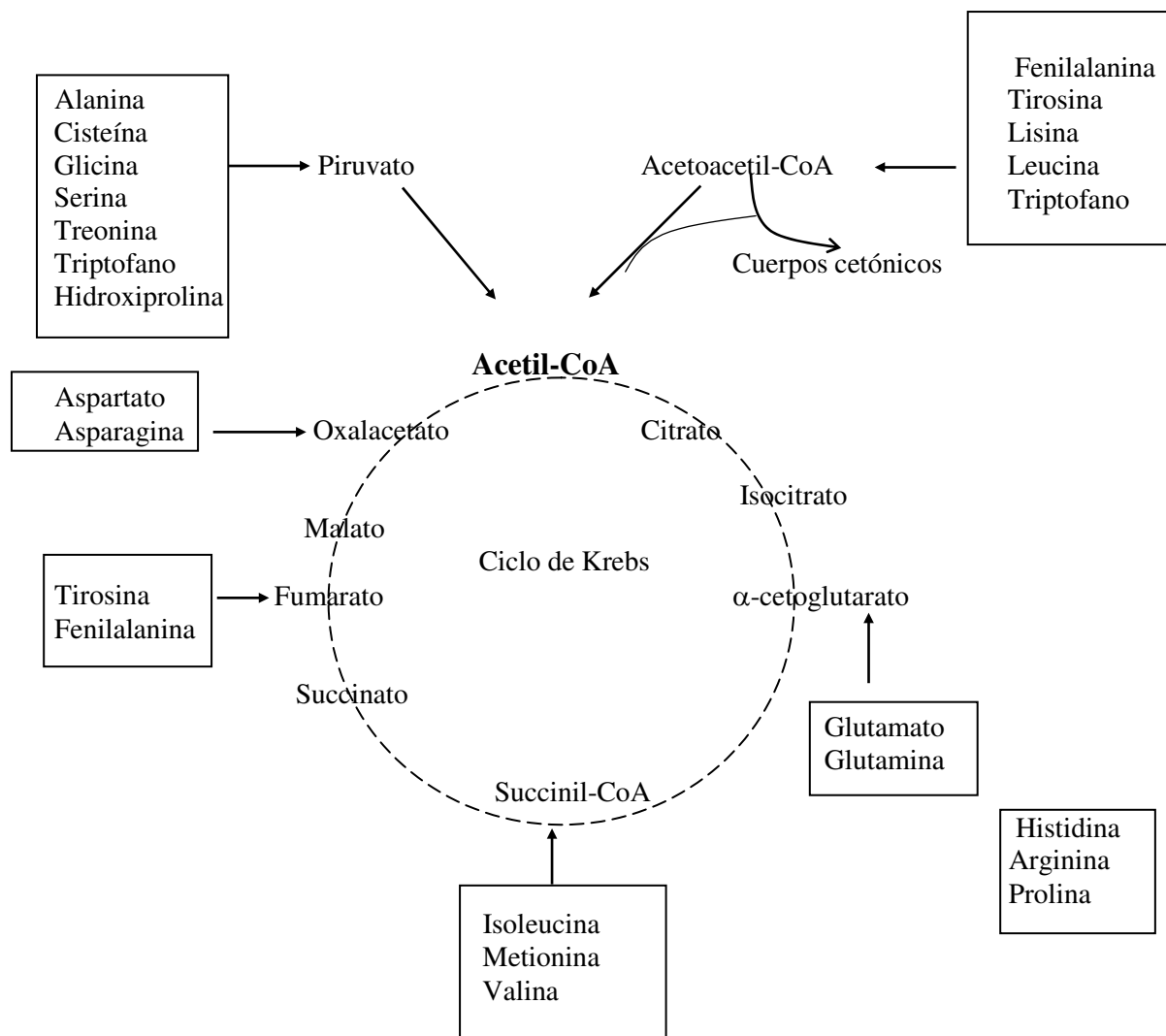
Ciclo de la urea

Los átomos de nitrógeno de los grupos alfa amino, separados de los aminoácidos durante su degradación oxidativa, son excretados por orina en forma de urea, amoníaco o ácido úrico, según la especie. La formación de urea tiene lugar en el hígado y es catalizada por una secuencia de reacciones enzimáticas que se denomina Ciclo de la Urea. Utiliza el amoníaco de las reacciones de desaminación oxidativa y CO_2 , incorporándose luego otro resto amino proveniente del aspartato. La urea es transportada por la sangre a los riñones y se elimina por orina.



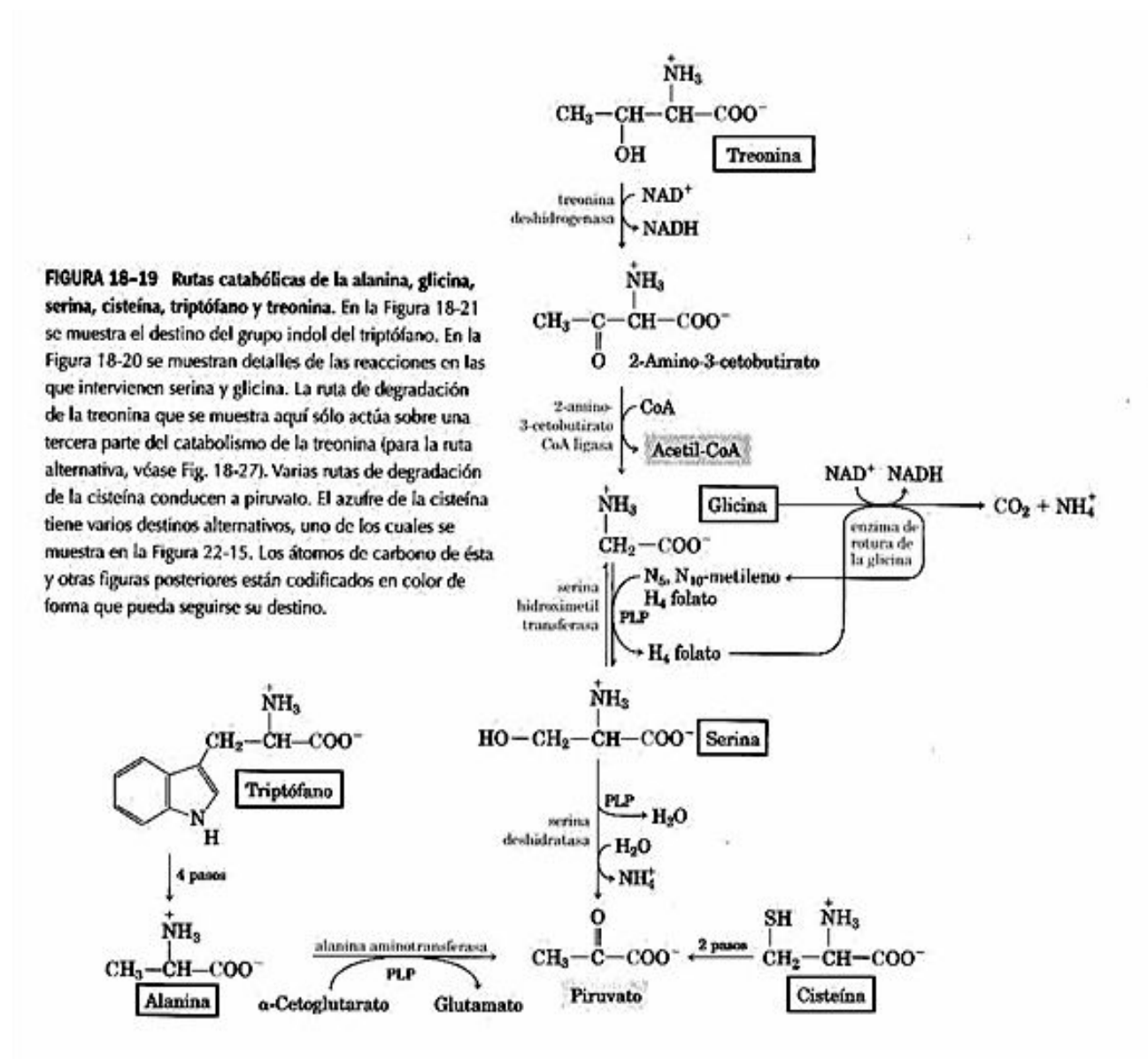
Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos

Para la degradación existen secuencias multienzimática que convergen finalmente en unas pocas rutas terminales que conducen al piruvato, a acetil-CoA o a los intermediarios del Ciclo de Krebs, como lo muestra el esquema siguiente:



La ruta del fumarato es seguida por algunos de los átomos de carbono de la tirosina y la fenilalanina.

Degradación de aminoácidos a piruvato



Extraído de: LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4ª ed. (2008).

Funciones precursoras de los Aminoácidos: Conversión a productos especializados. Amino biógenas.

La síntesis proteica es la función sintética principal de los aminoácidos, desde un punto de vista cuantitativo, pero además sirven como precursores de otros compuestos nitrogenados. Los compuestos, derivados de aminoácidos, fisiológicamente muy importantes, constituyen los llamados péptidos bioactivos, que incluyen al hem, purinas, pirimidinas, hormonas, neurotransmisores. Estos compuestos tienen gran importancia médica o farmacológica.

Glicina: La molécula entera de glicina es utilizada para la síntesis de **purinas**. El C α y el N se emplean en la síntesis del **hem**, y es precursora del **glutati6n**.

Histidina: Es precursora de **histamina** por descarboxilaci6n. En los tejidos de mamíferos, esta reacci6n es catalizada por una *descarboxilasa* (L-aminoácido aromático descaboxilasa). Esta enzima cataliza tambi6n la descarboxilaci6n de fenilalanina, tirosina, triptofano y DOPA. Est6 presente en riñ6n y otros tejidos. Emplea fosfato de piridoxal como coenzima.

La histamina es una amina bi6gena de gran actividad fisiol6gica. Disminuye la presi6n sanguínea, pudiendo provocar un colapso vascular, en grandes dosis. Estimula la secreci6n de CIH y pepsina en el est6mago.

Tirosina y triptofano: Por descarboxilaci6n se obtienen tiramina y triptamina respectivamente, ambas con acci6n vasoconstrictora.

Acido glutámico: Por descarboxilaci6n se forma el ácido γ -aminobutírico (**GABA**). La enzima que cataliza esta reacci6n se encuentra preferentemente en la sustancia gris del sistema nervioso central. El GABA es un intermediario químico regulador de la actividad neuronal. Actúa como inhibidor de la transmisi6n del impulso nervioso. Su deficiencia provoca cuadros de epilepsia. Farmacol6gicamente, el GABA se utiliza para tratamientos de epilepsia y de hipertensi6n.

Fenilalanina y tirosina: Pueden seguir otra vía metab6lica que conduce a la síntesis de sustancias de gran actividad fisiol6gica llegando a la formaci6n de catecolaminas, adrenalina, noradrenalina y dopamina.

Tirosina: Es precursora del pigmento que da color a la piel y el pelo, la melanina. Tambi6n es precursora de hormonas tiroideas: triyodotironina y tiroxina.

Triptofano: Este aminoácido es precursor de muchos compuestos de fundamental importancia para el hombre. Una de las vías que puede seguir este aminoácido comprende su hidroxilaci6n en el C5, formando así 5-hidroxitriptofano, el cual en una segunda etapa se descarboxila y forma 5-hidroxi-triptamina, tambi6n llamada **serotonina**. La serotonina es un poderoso vasoconstrictor y estimulante de la contracci6n del músculo liso.

PROBLEMAS DE APLICACI6N

Metabolismo de aminoácidos

- 1) ¿Por qu6 no podemos sintetizar Phe a partir de Tyr? La tirosina es un aminoácido no esencial, pero las personas con fenilcetonuria precisan tirosina en la dieta para un crecimiento normal, ¿por qu6?
- 2) Algunas personas sufren hipoglucemias benignas con v6rtigos y apatía varias horas despu6s de la última comida. Se ha comprobado que esto se puede evitar comiendo pequeñas cantidades de alimentos ricos en proteínas, a intervalos regulares entre comidas.

- a) ¿Qué será mejor: proteínas ricas en lisina, alanina o fenilalanina?
- b) En base a su respuesta anterior, en qué metabolismos están implicados cada uno de ellos.
- 3) El fosfato de piridoxal es la forma coenzimática de la vitamina B₆ y participa en numerosas reacciones del metabolismo de los aminoácidos. Indique cuatro ejemplos.
- 4) Los tres carbonos del lactato y de la alanina poseen estados de oxidación idénticos y los animales pueden emplear cualquiera de ellos como fuente carbonada para combustible metabólico. Compárese el rendimiento neto en ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa a CO₂ y H₂O, del lactato frente a la alanina cuando se incluye la excreción de nitrógeno en forma de urea.
- 5) Dos grupos de ratas fueron alimentadas con ¹⁵N-aspartato. Un grupo fue también alimentado con fluoracetato (el cual es convertido en fluorocitrato, que es un inhibidor de la aconitasa).

Después de tres días, los animales fueron sacrificados, las proteínas hepáticas hidrolizadas, y el glutamato se determinó por la presencia del ¹⁵N. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Grupo con ¹⁵ N-aspartato	Grupo con ¹⁵ N-aspartato y fluoracetato
Glutamato aislado % de ¹⁵ N	0,65	0,12

- . Explicar la disminución de la incorporación de ¹⁵N en el glutamato del segundo grupo.

GUIA DE ESTUDIO**Metabolismo de aminoácidos**

- 1-¿Cómo circula el amoníaco en el plasma?
- 2-¿Cómo se sintetiza glutamina? Formule la reacción completa.
- 3-¿En qué tejidos y órganos se hidroliza principalmente la glutamina? Qué importancia fisiológica tiene la liberación de amoníaco por orina?
- 4-¿Cómo explica la toxicidad del ión amonio en el SNC?
- 5-Reacciones de transaminación de GOT y GPT.¿Cuál es el cofactor que utilizan las transaminasas y cómo actúa?
- 6-Desaminación oxidativa: Reacción, cofactores, regulación.
- 7-Mecanismo general de trans-desaminación (transaminación + desaminación oxidativa) de aminoácidos.
- 8-Intermediarios del C. de Krebs se forman por degradación de cada uno de los aminoácidos.
- 9-¿En qué vías metabólicas pueden utilizarse los productos de degradación de los aminoácidos?
- 10-¿Cuáles son los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos? Dar ejemplos.

Ciclo de la urea

- 12-¿En qué órganos se lleva a cabo el ciclo de la urea?
- 13-¿En qué lugar de la célula ocurren las diferentes reacciones del ciclo y qué funciones cumple?
- 14-¿De cuáles aminoácidos provienen los nitrógenos de la urea?
- 15-¿De qué reacción proviene el primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea en forma de amoníaco libre?
- 16-¿Cuáles son las reacciones que consumen energía y cuántos enlaces ricos en energía se gastan en cada una de ellas?
- 17-¿Qué productos de desecho se eliminan por el ciclo de la urea?

Funciones precursoras de los aminoácidos

- 18-Aminas biógenas. Importancia. Ejemplos.

METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS PARTE B

Introducción

La biosíntesis de los **desoxirribonucleótidos y de los ribonucleótidos**, constituye un proceso fundamental en todas las células, puesto que los nucleótidos son los **precursores directos del DNA y del RNA**, y además muchos participan en el metabolismo como coenzimas.

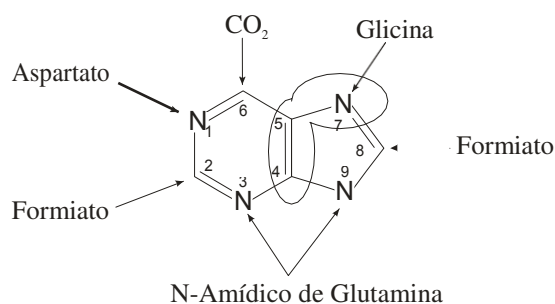
Un aspecto importante de la biosíntesis de los nucleótidos lo constituye la ruta de formación de sus bases: las pirimidinas y las purinas. Tanto los nucleótidos como sus bases nitrogenadas se emplean con economía, en la mayoría de los organismos no se utilizan como fuente de energía

En el DNA la pentosa es la 2-D-desoxirribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son Adenina y Guanina y las derivadas de la pirimidina son Timina y Citosina.

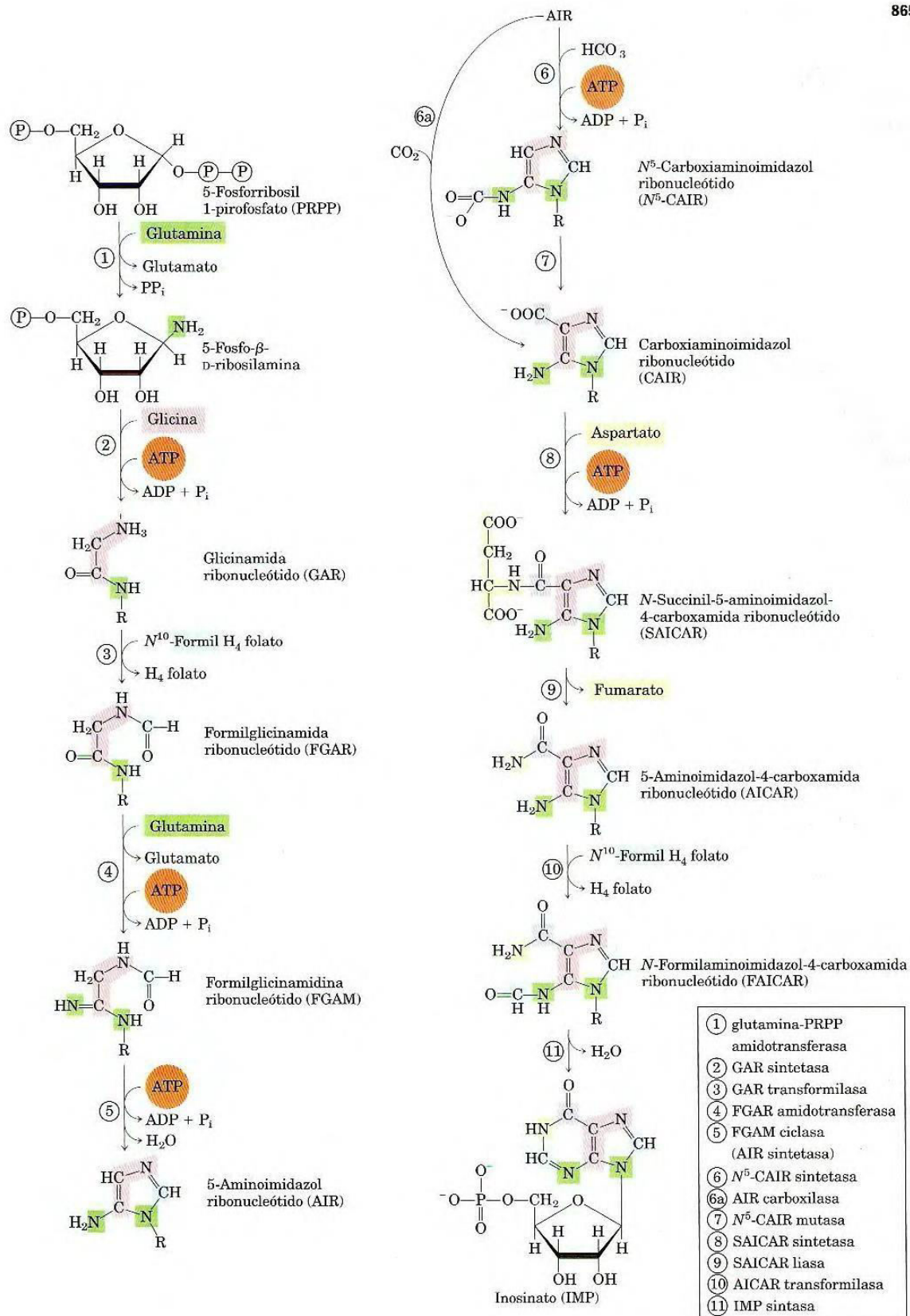
En el RNA la pentosa es la D-ribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son Adenina y Guanina y las derivadas de la pirimidina son Uracilo y Citosina.

Biosíntesis de ribonucleótidos púricos

Se ha podido determinar el origen de cada uno de los carbonos y nitrógenos del núcleo de la purina:



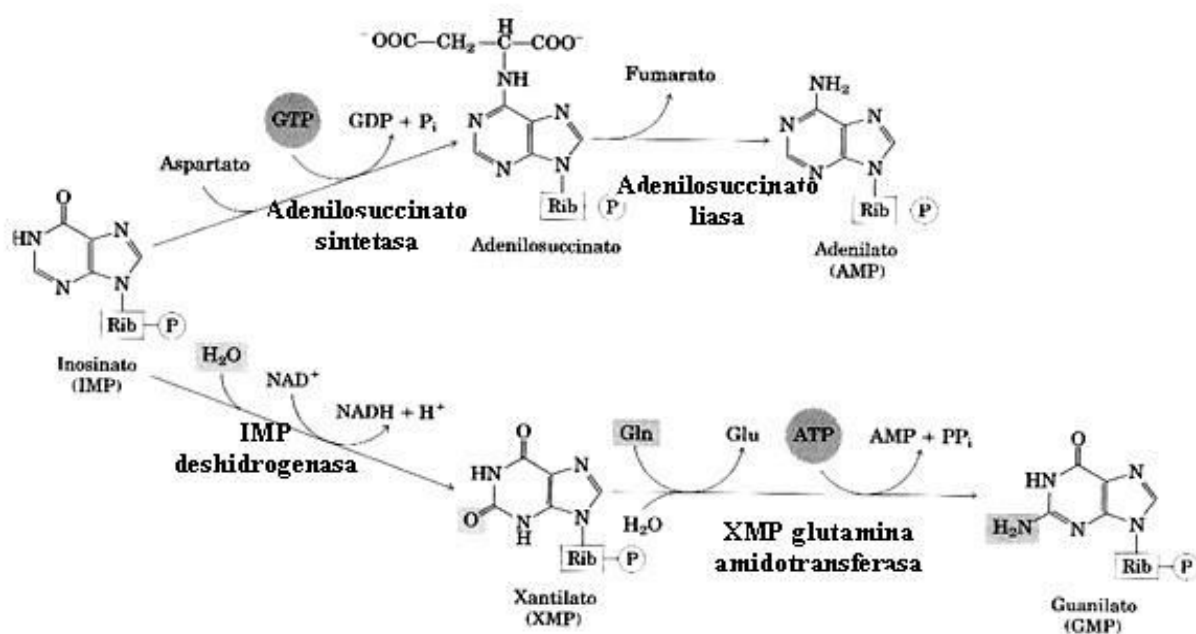
Aunque podría esperarse que se sintetizase el anillo de purina en primer lugar y se uniese después la porción de fosfato de ribosa, la biosíntesis de los ribonucleótidos púricos comienza con el ribosa-5-fosfato y se construye sobre el anillo de purina en etapas sucesivas.



Extraído de Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta edición

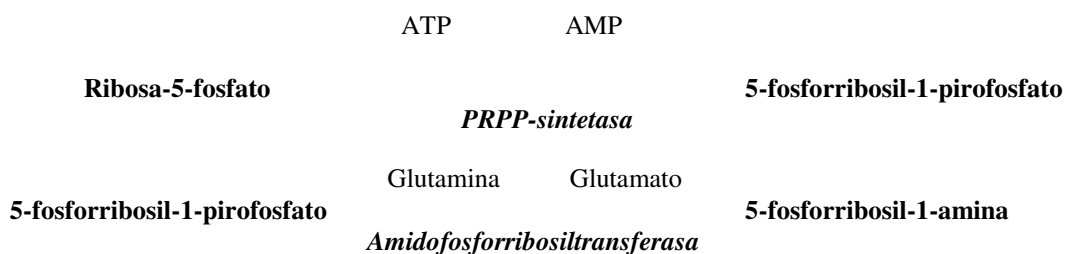
La reacción completa es: $2 \text{NH}_3 + 2 \text{HCOOH} + \text{CO}_2 + \text{Glicina} + \text{Glutamina} + \text{Aspartato} + \text{Ribosa-5-fosfato} + 5 \text{ATP} \longrightarrow \text{IMP} + \text{Fumarato} + 4\text{ADP} + \text{AMP} + \text{PPi} + 4 \text{Pi}$

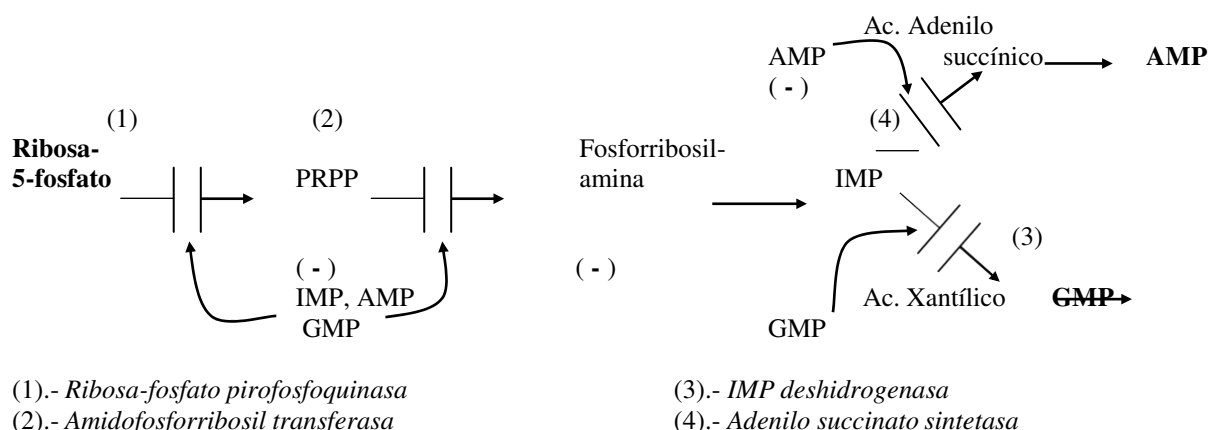
El AMP y el GMP (nucleótidos de purina) derivan del monofosfato de inosina (IMP) como se indica en el siguiente esquema:



Regulación de la síntesis de purina.

La síntesis de purina está regulada por retroalimentación a nivel de las dos primeras reacciones: la formación de PRPP (5 fosforribosil-1-pirofosfato) por la enzima *PRPP-sintetasa* y de la formación de 5 fosforribosil-1-amina por la enzima *amidofosforribosiltransferasa*, siendo este último el principal sitio de control. Los nucleótidos AMP, ADP, ATP, GMP, GDP y GTP actúan como inhibidores. Se puede esquematizar de la siguiente forma:





Por otro lado el GTP es utilizado en la síntesis de AMP mientras que el ATP en la síntesis de GMP. Esto lleva que haya un equilibrio en la síntesis de los ribonucleótidos de adenina y guanina. Cuando se acumula **GTP activa** la enzima *adenilo succinato sintetasa* produciéndose más ATP. Cuando se acumula **ATP** se **activa** la enzima *GMP-sintetasa* aumentando los niveles de GTP.

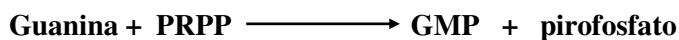
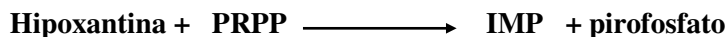
Vía de recuperación de purinas

Las bases púricas libres, ya sea que procedan de la alimentación ó del catabolismo de los ácidos nucleicos, pueden ser recicladas en AMP ó GMP mediante las siguientes vías-

El mecanismo principal reside en la reacción de la *adenina-fosforribosil-.transferasa*:

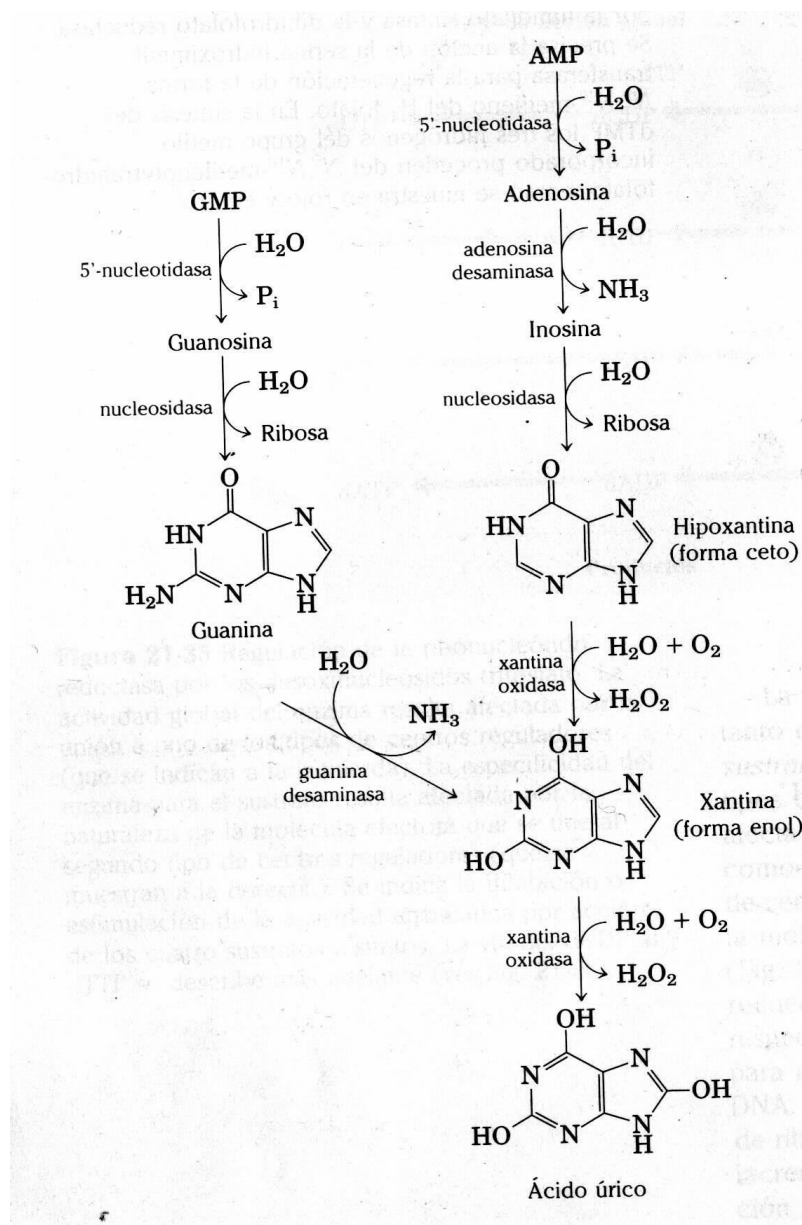


En una reacción semejante, la hipoxantina y la guanina son transformadas en los nucleótidos correspondientes por acción de la *hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa*.



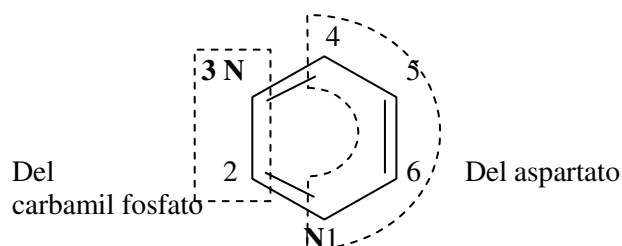
Catabolismo de Purinas

Si las bases libres no son recuperadas y reutilizadas, son degradadas y sus productos finales excretados. La degradación de purinas a ácido úrico ha sido muy estudiada. Las principales purinas, adenina y guanina, se convierten en xantina, la cual es oxidada a ácido úrico por la acción de la enzima xantina oxidasa.

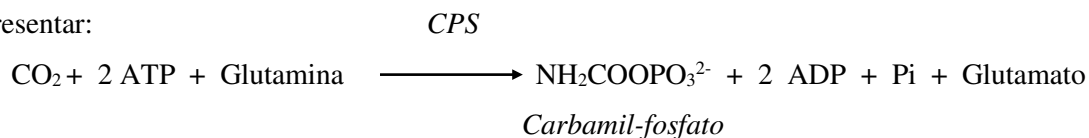


C) Biosíntesis de Nucleótidos Pirimidínicos

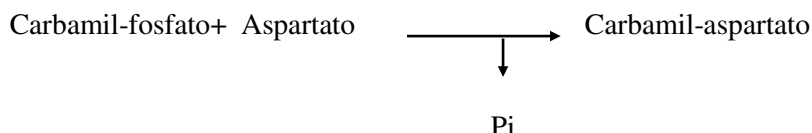
La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina transcurre de una manera algo diferente de la de los nucleótidos de purina. En este caso el anillo de pirimidina de seis términos es el que se sintetiza primero y luego se une al fosfato de ribosa. Se necesita carbamil fosfato y aspartato como precursores. La contribución de ambos compuestos en la formación del anillo de pirimidina se puede representar así:



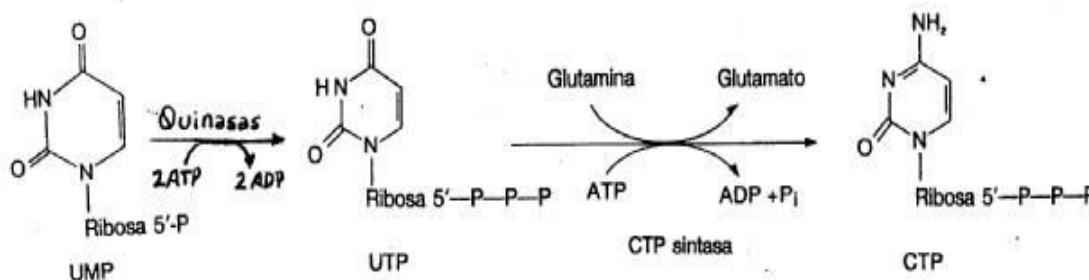
El primer paso de la síntesis es la formación del carbamifosfato. El grupo-amino procede de la deaminación de glutamina. La reacción catalizada por una *carbamil fosfato sintetasa* (CPS) se puede representar:

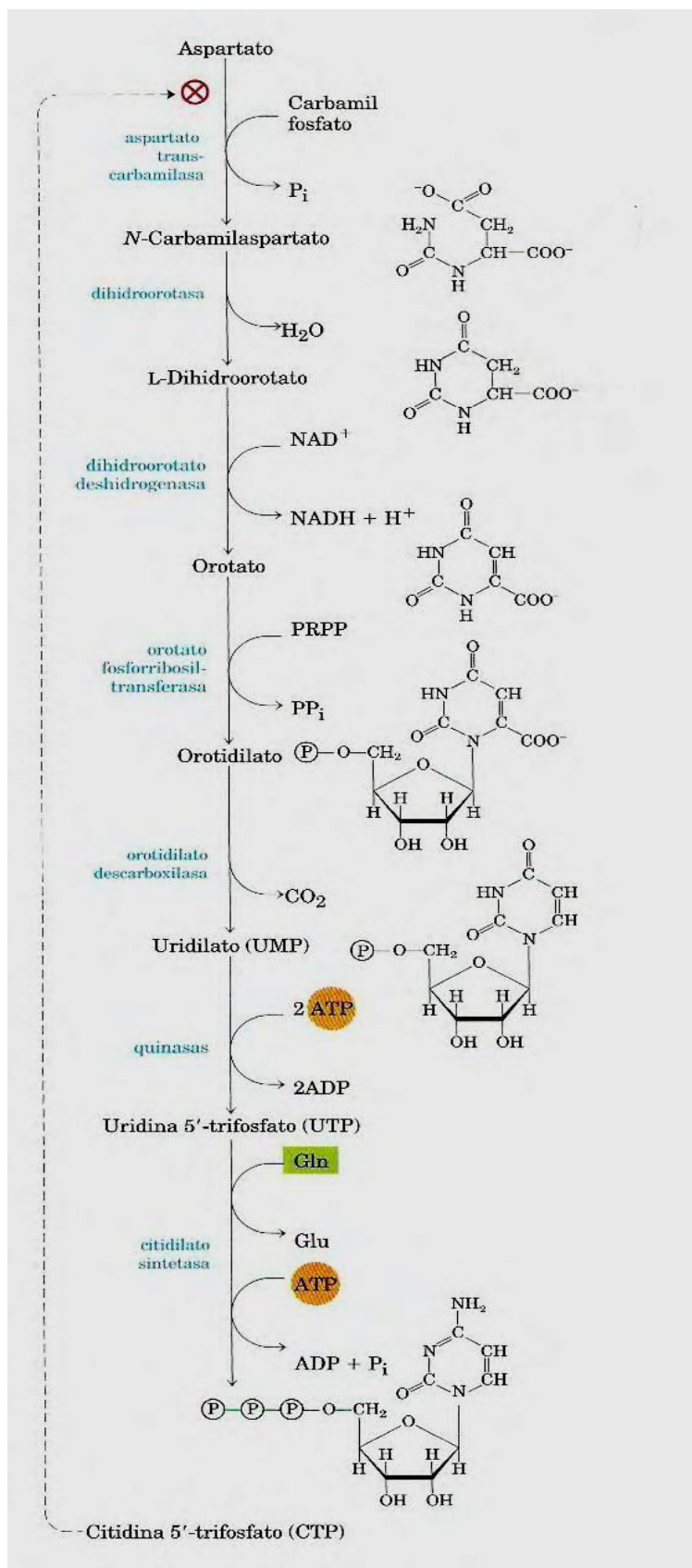


Una vez formado el carbamil-fosfato, éste se combina con aspartato para formar carbamil-aspartato. La reacción es catalizada por la *aspartato transcarbamilasa*, enzima alostérica que constituye el principal sitio de regulación:



Después de tres pasos se obtiene el primer nucleótido de pirimidina (UMP) el cual se convierte posteriormente en UTP y CTP.





Extraído de Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta edición.

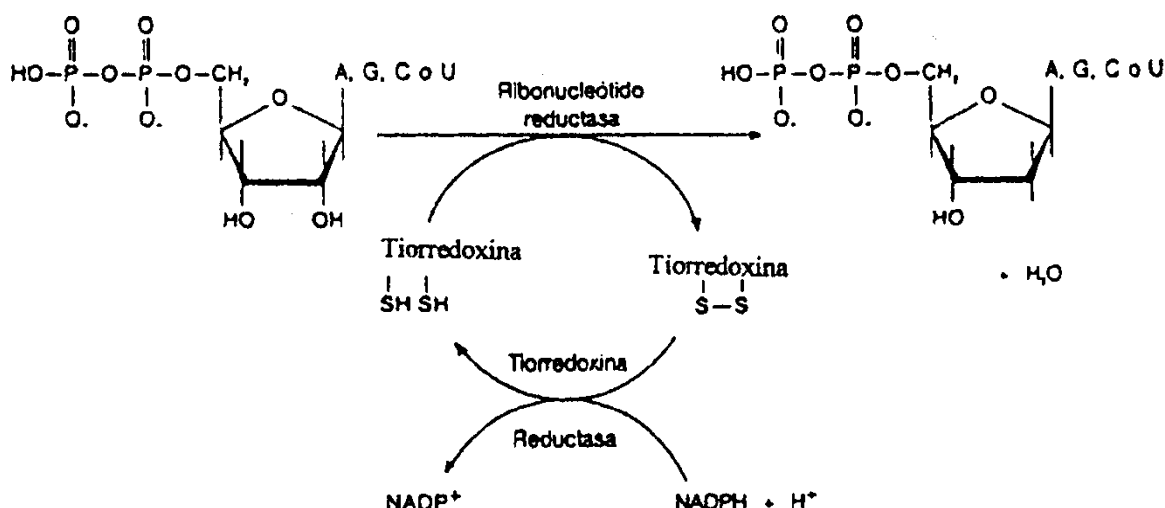
La síntesis de pirimidinas está regulada por la enzima alostérica *Aspartato transcarbamilasa* a través del CTP producto final de la vía.

D) Biosíntesis de Desoxirribonucleótidos

Normalmente los desoxirribonucleótidos no se sintetizan a partir de la desoxirribosa como elemento de construcción, sino que se forma por reducción directa del carbono 2' de los correspondientes ribonucleótidos.

Esta vía ha sido muy estudiada en *E. coli*, donde los 4 ribonucleósidos difosfatos (ADP, GDP, UDP, CDP) son directamente reducidos a los correspondientes desoxi-análogos (dADP, d-GDP, dUDP, dCDP) por un sistema enzimático múltiple.

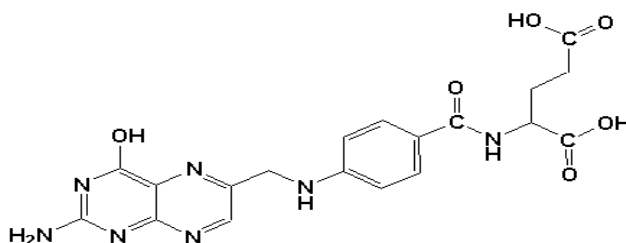
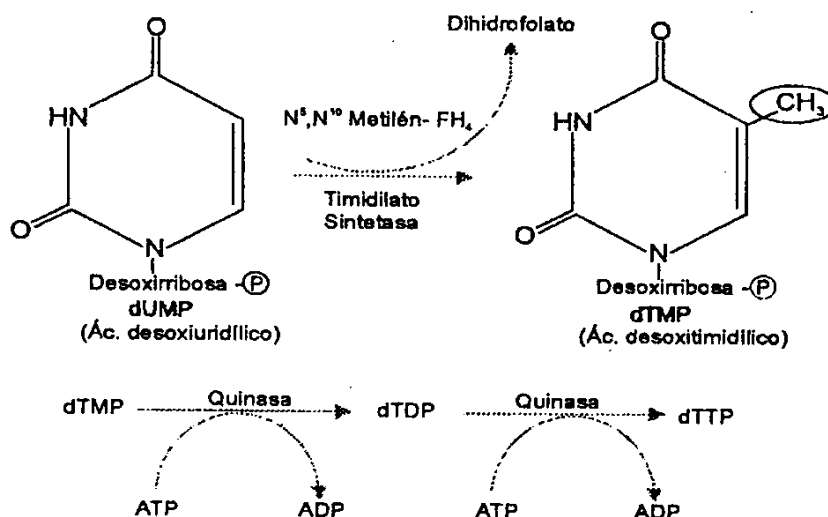
En el siguiente esquema se muestra la reducción en general de los nucleósidos difosfatos en los correspondientes desoxi-nucleósidos difosfatos.



El control alostérico se realiza a nivel de la enzima *ribonucleótido difosfato reductasa*.

El dATP actúa como inhibidor general de todos los ribonucleósidos-5-difosfatos.

Como el DNA contiene **timina** en lugar de **uracilo**, el **d-TMP** (ácido desoxitimidílico) se forma a partir del **d-UMP** (ácido desoxiuridílico) por acción de la enzima *timidilato sintetasa*, actuando el N^5N^{10} **Metilén-FH₄** como dador del grupo **metilo**.



Estructura del Ácido fólico

E) Origen del tetrahidrofolato y sus transformaciones a derivados transportadores de un carbono

El ácido fólico, que se encontró primeramente en las hojas de espinaca, está ampliamente distribuido en las plantas. Su deficiencia en mamíferos provoca una disminución de crecimiento y aparición de diversas formas de anemias.

Contiene tres sillares característicos:

- una pteridina sustituida
- ácido p-aminobenzoico
- ácido glutámico.

El síntoma bioquímico más sobresaliente de la deficiencia de ácido fólico es el impedimento de la biosíntesis de las purinas y de la timina (pirimidina). La forma coenzimática del ácido fólico actúa en la transferencia de ciertos fragmentos monocarbonados utilizados en ésta y otras rutas biosintéticas.

El ácido tetrahidrofólico (FH_4) actúa como transportador intermediario de grupos

hidroximetilos, formilo y metilo, en gran número de reacciones enzimáticas.

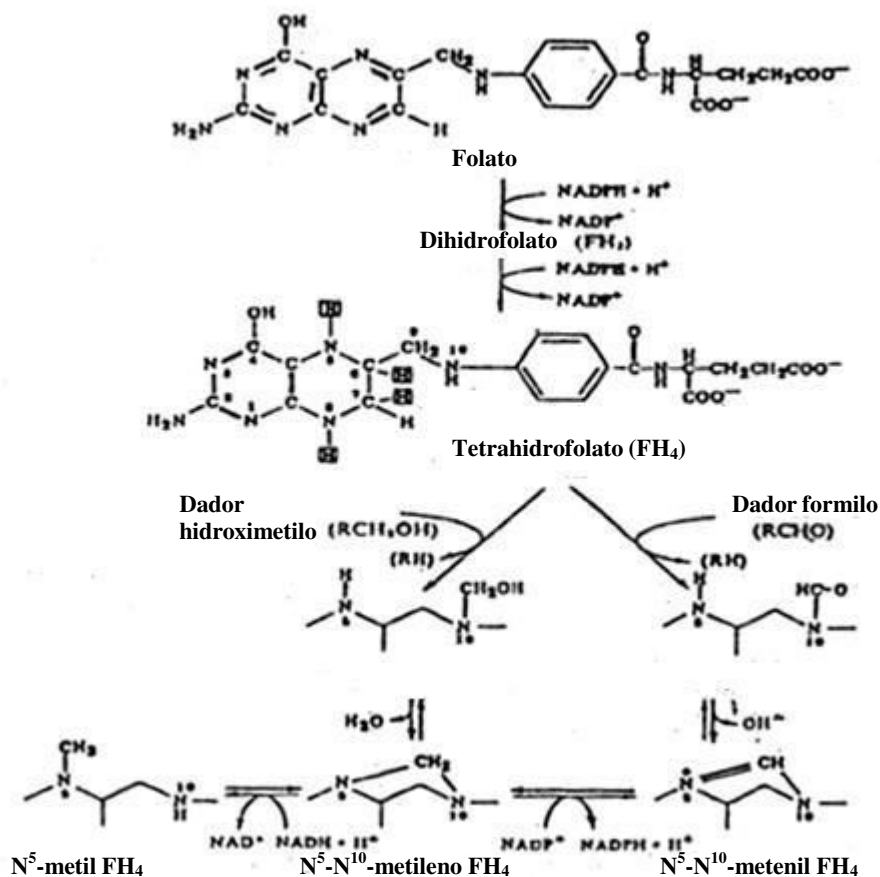


Fig. 1.33: Ácido Fólico y sus derivados.

PROBLEMAS DE APLICACIÓN

Metabolismo de nucleótidos

- Indicar la posición principal en el anillo purínico y/o pirimídico de las células expuestas a:
 - ^{15}N -aspartato
 - ^{14}C -serina (grupo hidroximetilo marcado)
 - 3H -oxalacetato
- La timidilato sintasa humana puede ser inhibida eficaz y específicamente por la administración de:
 - uridilato (dUMP)
 - trimetoprim
 - 5-flúoruracilo (5-FU)
 - Sulfanilamida
 - Metotrexato

Indique cual es la droga que inhibe la enzima y qué acción tienen todas en el metabolismo de nucleótidos

- 3) Las células mutantes incapaces de sintetizar nucleótidos por las vías de recuperación resultan ser instrumentos muy útiles en la biología molecular y celular. Supongamos que la célula A carece de timidita quinasa, una enzima que cataliza la fosforilación de timidita a timidilato, y que la célula B carece de hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa.

Las células A y B no crecen ni se dividen en un medio HAT que contiene hipoxantina, aminopterina o metotrexato y timina. Sin embargo la célula C, formada por la fusión de A y B, crece en este medio, ¿Por qué?

- 4) Con frecuencia se administra alopurinol a los pacientes con leucemia aguda que reciben tratamiento con fármacos anticancerígenos. ¿Por qué se utiliza el alopurinol en estos casos?

- 5) La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenada causa hiperuricemia. Esta también puede inducirse en individuos normales mediante la ingestión de alcohol o ejercicio extenuante. Proponer un mecanismo común que explique estos resultados.

GUIA DE ESTUDIO**Metabolismo de nucleótidos**

- 1-Bases púricas y pirimidínicas. Origen de los átomos de C y de N del núcleo de purina y de pirimidina.
- 2-¿Qué compuestos ó intermediarios son comunes en la biosíntesis de los nucleótidos púricos y pirimídicos?
- 3-En la biosíntesis del fosforribosil pirofosfato ¿cuáles compuestos se requieren?

Nucleótidos púricos:

- 4-Formule las dos primeras reacciones de la síntesis de bases púricas. Enzimas intervinientes.
- 5-Estructura del ácido inosínico. Acción de (a) deshidrogenasa y (b) sintetasa. Productos
- 6-Mencione las dos bases púricas que obtiene a partir del IMP.
- 7-Formule las reacciones de degradación de adenina hasta ácido úrico.
- 8-¿A nivel de qué enzimas está regulada su biosíntesis
- 9-¿Cuál es el producto final de su degradación? Características de solubilidad del Ácido úrico.
- 10-Acción del alopurinol.
- 11-En la vía de recuperación de bases púricas ¿Qué enzima interviene en cada una de las reacciones?

Nucleótidos pirimídicos:

- 12-Formular las dos primeras reacciones de la síntesis de bases pirimidínicas. Enzimas intervinientes.
- 13-Productos finales UTP y CTP.
- 14-¿Cuáles son las bases pirimidínicas que conoce?
- 15-¿Qué enzima interviene en su regulación y cuál es el compuesto que la inhibe?

Desoxirribonucleótidos

- 16-Precursores. Enzima. Coenzima
- 17-En la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos ¿Qué átomo de carbono se reduce y cuál es la enzima que cataliza la reacción?
- 18-Mencione los desoxi-mononucleótidos que conoce.
- 19-Esquematice la síntesis de desoxitimidinmonofosfato indicando enzima y cofactores.

TRABAJOS PRÁCTICOS DE LABORATORIO

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°1
BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.
MANEJO DE INSTRUMENTAL: ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA
LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Conocer las normas de seguridad para el correcto desempeño en el laboratorio biológico.
- ✓ Adquirir destreza en el uso del material e instrumental del laboratorio.
- ✓ Comprender el fundamento de la utilización de curvas de calibración para obtener el valor de concentración de una sustancia en solución.
- ✓ Realizar curva de calibración de proteínas que se utilizará en trabajos prácticos posteriores.

Riesgo biológico

La manipulación o exposición a los agentes biológicos puede traer como consecuencia la infección del personal expuesto, con o sin manifestación enfermedad. En el hombre, el riesgo de infección es el más significativo (por la frecuencia e importancia) y el más antiguo de los reconocidos por los profesionales de la salud. Entre las causas atribuidas a las infecciones del personal de laboratorio se destacan: el uso de objetos punzo-cortantes contaminados con fluidos corporales, los derrames o salpicaduras, el trabajo con animales de laboratorio, no tomar las adecuadas medidas de protección, etc.

Reglas críticas de higiene y seguridad

Al formarse como profesional, debe tener en cuenta una serie de normas, que contribuirán a llegar a resultados exactos, a un correcto desempeño en las actividades a desarrollar en un laboratorio, y al cuidado de la salud.

Normas de bioseguridad que el alumno deberá cumplir para trabajar en el laboratorio

Las normas de seguridad están hechas para la protección de su vida, por lo tanto su cumplimiento es **OBLIGATORIO**. A saber:

- 1) Los pasillos de circulación, vías de evacuación y puertas de emergencia del laboratorio deben ser de libre circulación y no estar obstruidas.
- 2) El uso del guardapolvo y guantes de látex es obligatorio dentro del laboratorio. El uso de barbijo y lentes es obligatorio en el trabajo práctico que lo requiera.

- 3) No se permitirá la entrada a los laboratorios con pantalones cortos, chinelas o cabello largo suelto.
- 4) Está terminantemente prohibido fumar, comer, e ingerir bebidas en el laboratorio.
- 5) Deberá mantener su mesada y piletas limpias. Para ello a cada trabajo práctico **debe traer una rejilla o repasador limpio.**
- 6) Al comenzar el trabajo práctico, todo el material debe estar limpio y seco para evitar inexactitudes.
- 7) No malgaste los reactivos. No los impurifique con pipetas sucias, esto perjudicará su trabajo y el de sus compañeros. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
- 8) Cuando trabaje con material biológico (sangre total, suero, orina) **utilice guantes**, considerélo material infecto contagioso, por lo tanto use los elementos de protección individuales adecuados.
- 9) Los tips y pipetas, luego de ser utilizados deberán ser descartados dentro de los correspondientes recipientes con lavandina, para una descontaminación previa al lavado final. **No los deje apoyados sobre la mesada.**
- 10) No deberá pipetear ácidos, álcalis, o cualquier producto corrosivo o tóxico, con la boca, use una pera o propipeta. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, **avise de inmediato al personal docente.**
- 11) Si algún líquido corrosivo toca su cuerpo, use la **ducha** y lave la zona afectada con abundante agua, si los afectados son los ojos use el **lavajojos** y lávelos durante 15 minutos luego solicite primeros auxilios.
- 12) Todas las operaciones que desprendan gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse **bajo la campana extractora sin excepción.**
- 13) En caso de derrame de ácidos ó solventes se procederá a volcar sobre el mismo un balde de arena destinado a tal fin, ubicado en nuestro laboratorio, en la mesa lateral.
- 14) Cuando realice la **dilución de un ácido** proceda a añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. **Nunca añadir agua al ácido** (*no se debe bañar el ácido*).
- 15) **Uso y Tratamiento de reactivos y soluciones químicas:**
 - a- Al usar cualquier tipo de reactivos, asegúrese que es el correcto y **lea bien su etiqueta**. Si es transferido a otro recipiente, **rotúlelo de nuevo.**
 - b- Todos los reactivos deberán manejarse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.
 - c- No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.
 - d- **No manipular productos inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos.**

e- Cuando un reactivo requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelos con un tapón de vidrio esmerilado o de goma, **nunca lo haga con la mano.**

f- Al calentar una solución y/o reactivo, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto.

g- Al calentar una solución en un tubo de ensayo debe hacerse bajo el nivel del líquido y agitando constantemente. **No apuntar el tubo** hacia compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.

h- Cualquier material caliente debe colocarse sobre una placa resistente al calor.

i- Algunos desperdicios líquidos podrán desecharse en las piletas de descarga con un rango pH moderado de 6-8, dejando correr suficiente agua, ya que muchos de ellos pueden ser corrosivos.

Soluciones alejadas de estos pH deberán primero **ser neutralizadas antes de desecharlas.**

16) Todos los desperdicios sólidos y papeles, no patológicos o contaminantes, deberán colocarse en los botes de basura. Los residuos sólidos patológicos o contaminantes **deberán desecharse en los recipientes con bolsas rojas** destinados a tal fin. El material de vidrio roto deberá descartarse en recipientes especiales para ese efecto.

17) Luego de finalizado el trabajo práctico, lave el material, enjuáguelo con agua destilada y déjelo secar.

18) Controle que todo el instrumental que utilizó (espectrofotómetro, centrífugas, peachímetro, etc.) quede limpio, apagado y cubierto con su funda si fuera necesario.

19) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional. En el laboratorio **no corra, camine.**

ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN

Como otra aplicación del TP N°1, Bioseguridad y Manejo de Instrumental de laboratorio, se realizará una curva de calibración para determinación de proteínas por el método de Lowry.

Una curva de calibración es una curva de referencia construida con concentraciones conocidas y crecientes de una sustancia (por ejemplo, albúmina sérica bovina) que se utiliza para determinar la cantidad de esa sustancia (en el caso del ejemplo, proteínas) presente en una muestra incógnita. A la sustancia de concentración perfectamente conocida que se utiliza para construir la curva de referencia (albúmina) se la denomina patrón, testigo o estándar.

En muchas determinaciones se cumple una relación proporcional entre la magnitud o **intensidad de color** que da una reacción y la **cantidad del reactivo** que la provoca. Por ejemplo: si la presencia de 10 ug de proteínas en una solución genera la aparición de un color azul pálido cuando es agregada a una mezcla reactiva, la presencia de 20 ug de proteína dará lugar a que la solución se torne azul más oscuro y así sucesivamente.

Si se mide y se grafica, la intensidad de color desarrollado en función de las concentraciones crecientes de la sustancia patrón, se obtiene una curva que luego, por interpolación, permite calcular la concentración de la misma en la muestra incógnita.

Espectrofotometría. Ley de Lambert y Beer

Los principios de la Absorciometría espectrofotométrica son frecuentemente utilizados en el Laboratorio biológico para la cuantificación e identificación de reacciones químicas y enzimáticas.

Los métodos absorciométricos permiten determinar la fracción de radiación absorbida por un componente en estudio. Estos son métodos ópticos basados en la absorción o emisión de energía radiante.

La espectrofotometría de Absorción se puede realizar en la zona ultravioleta (región UV: 200-400 nm de longitud de onda) y en la zona visible (región visible: 400-800 nm) del espectro electromagnético, usando equipos llamados espectrofotómetros y fotocolorímetros.

Si la luz blanca atraviesa una solución que contiene un componente coloreado, ciertas longitudes de onda (λ) son selectivamente absorbidas y el color resultante se debe a la luz transmitida. Cada sustancia tiene un espectro de absorción característico que permite identificarla.

Si la luz incidente de una determinada longitud de onda es absorbida por una sustancia, la cantidad de luz absorbida por la misma permite cuantificarla.

Cuando sobre una celda de paredes planas, paralelas que contienen una solución transparente, sin material en suspensión, incide en forma perpendicular un haz de rayos paralelos de luz monocromática (de longitud de onda específico) la energía de la luz incidente se distribuye principalmente en dos:

- a) la energía absorbida por la solución

- b) la energía transmitida que es lo percibido por el ojo humano o detector del espectrofotómetro y cuya intensidad a una determinada longitud de onda, está vinculada a la “concentración de la especie absorbente” y a la “longitud del camino óptico”

Estas observaciones fueron generalizadas en la Ley de Lambert y la de Beer, que rigen la Espectrofotometría.

Lambert estableció que la cantidad de luz absorbida, a una determinada longitud de onda, depende del espesor del medio absorbente (longitud del camino óptico), lo cual conduce a la siguiente expresión matemática.

$$I = I_0 \cdot e^{-k' \cdot l} \quad (1)$$

I: intensidad de la luz transmitida

I_0 : intensidad de la luz incidente

l: longitud del camino óptico (espesor de la cubeta, constante)

k' : constante que depende de la temperatura, naturaleza del medio y λ

Beer generalizó que la intensidad de la luz absorbida es directamente proporcional al logaritmo de la concentración de componente en solución:

$$I = I_0 \cdot e^{-k'' \cdot c} \quad (2)$$

c: concentración de la especie absorbente (moles/ litro)

k'' : depende directamente de l y de λ

La Ley de Beer expresa lo mismo que la de Lambert pero con respecto a la concentración del componente interpuesto en el camino del haz.

Si se consideran ambas variables, l y c, en forma simultánea se tiene

$$I = I_0 \cdot e^{-k'' \cdot l \cdot c} \quad (3)$$

En otra forma:

$$I = I_0 \cdot 10^{-a \cdot l \cdot c} \quad (4)$$

Ley de Lambert – Beer

Donde a: absorptividad = $k'' / 2,303$

Definiendo **transmitancia** como:

$$T = I / I_0$$

y reemplazando en (4) se obtiene:

$$I / I_0 = T = 10^{-a \cdot l \cdot c} \quad (5)$$

La **Absorbancia**(en el pasado llamada Densidad óptica) se define como:

$$A = -\log T \quad \text{ó} \quad A = \log 1/T \quad (6)$$

Tomando log en (5) y multiplicando ambos miembros por -1 se obtiene:

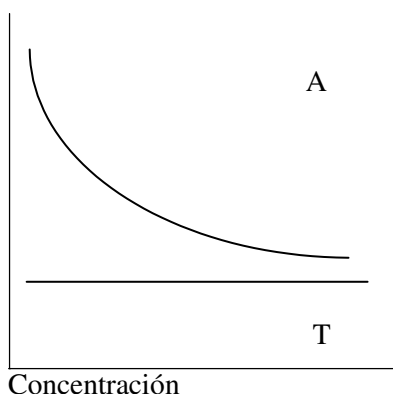
$$A = a \cdot l \cdot c$$

Como las cubetas que se utilizan están calibradas en ancho constante, entonces entre la absorbancia y concentración existe una relación lineal.

Cuando **c** esta expresada en mol/l y **l** en cm; **a** expresa la absortividad molar o **Coefficiente de Absorción molar** (ϵ)(en unidades litros / mol . cm)

Entonces la **Ley de Lambert y Beer** se puede escribir también: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

En Absorciometría se puede utilizar la expresión de transmitancia (T), pero es más útil la absorbancia (A), debido a su dependencia lineal con la concentración y la longitud del camino óptico, como lo muestra el siguiente gráfico:

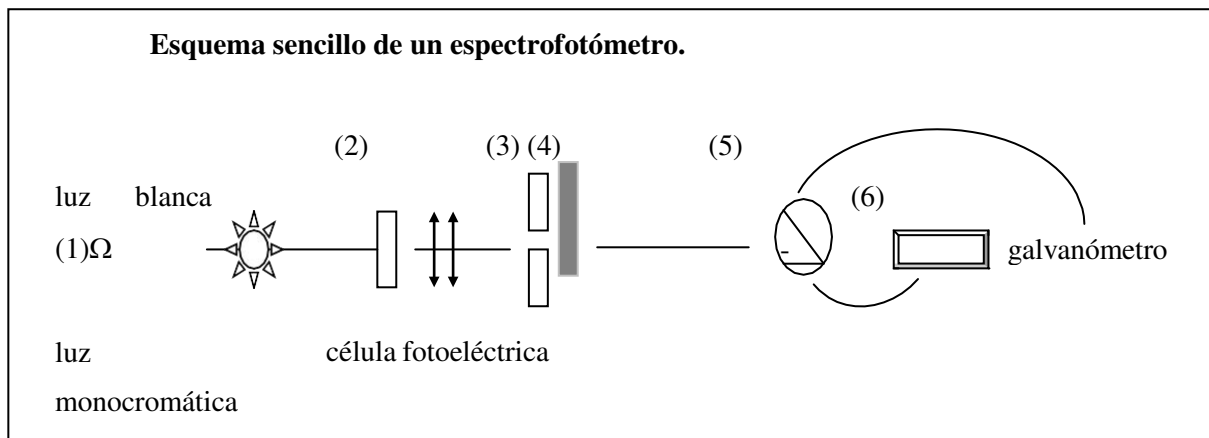


La Ley de Lambert es exacta y aplicable a cualquier medio absorbente (gas, líquido, solución), pero la de Beer tiene excepciones (alteración en los instrumentos, factores químicos implicados en la reacción y otros errores).

Las medidas se realizan habitualmente con un espectrofotómetro, cuyos componentes principales son:

1. Fuente de radiación: lámpara de W, H₂ o Deuterio.
2. Control de longitud de onda: prisma o red de difracción.
3. Ranura ajustable.

4. Receptáculo para la solución muestra: cubeta de vidrio, cuarzo o plástico.
5. Fotodetector: célula fotoeléctrica.
6. Instrumento de medida: galvanómetro o potenciómetro.

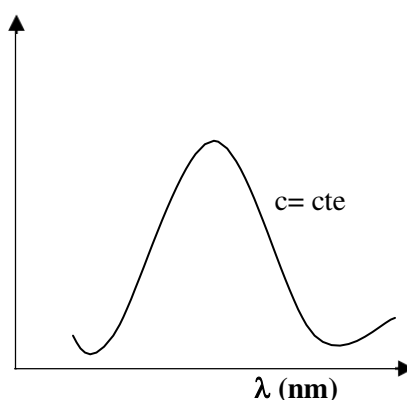


La celda o cubeta debe tomarse por sus caras opacas y colocarla de forma que la radiación incida sobre las caras pulidas.

Medidas espectrofotométricas:

1. La Absorbancia de una solución de la sustancia a determinar se lee a una concentración tal que dicha absorbancia caiga entre 0,3 y 0,7 unidades.
2. Con la misma solución se realiza una Curva Espectral a una concentración constante. Se mide la A variando la λ . A partir de esta curva se selecciona la λ máxima, para usarla como λ de trabajo.

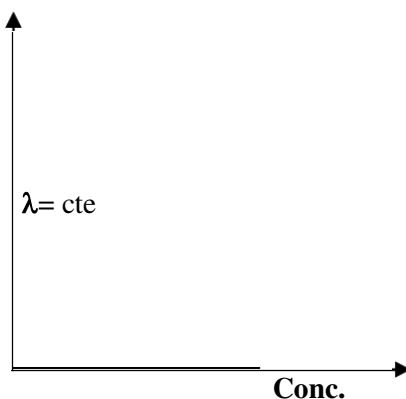
A



3. Se preparan una serie de soluciones patrón del componente a determinar de concentración creciente y perfectamente conocida, con concentraciones que estén en el rango de 0.100 y 0.700 unidades de A.
4. Si es necesario se realiza una reacción de color con un reactivo cromogénico adecuado, tanto en las soluciones patrones como en la muestra.

5. Se lee la A de los patrones a la λ seleccionada (a partir de la Curva Espectral), manteniéndola cte. La gráfica A vs Concentración permite verificar la Ley de Beer y calcular el valor de ϵ . La representación gráfica de la misma se la denomina **curva de calibración**.

A



6. Se mide la A de la muestra desconocida a la misma λ y se determina su concentración usando el valor de ϵ calculado o interpolando en la curva de calibración.

7. Las medidas espectrofotométricas se realizan tomando como referencia una solución **Blanco** que contiene todos los reactivos y fue tratado en condiciones experimentales igual que la muestra, pero **no** contiene la sustancia a determinar.

La **Curva de Calibración** permite así el cálculo de la concentración del componente, que absorbe a esa longitud de onda. Dado que se trabaja con datos reales, los gráficos que se obtienen no son tan ideales, pero esta situación no es un obstáculo ya que dentro de ciertos valores es posible trazar la recta más probable que une una serie de puntos, con el uso de los programas de cálculo de las computadoras. Dicha respuesta no es lineal en todo el rango de concentraciones posibles, sino dentro de un conjunto de valores que dependen de numerosos factores dependientes del método de medición. En general los equipos de medición mantienen la linealidad para valores de absorbancia menores a uno. En este trabajo práctico se confeccionará la curva de calibración para la **determinación de proteínas**.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNAS

Fundamento Teórico

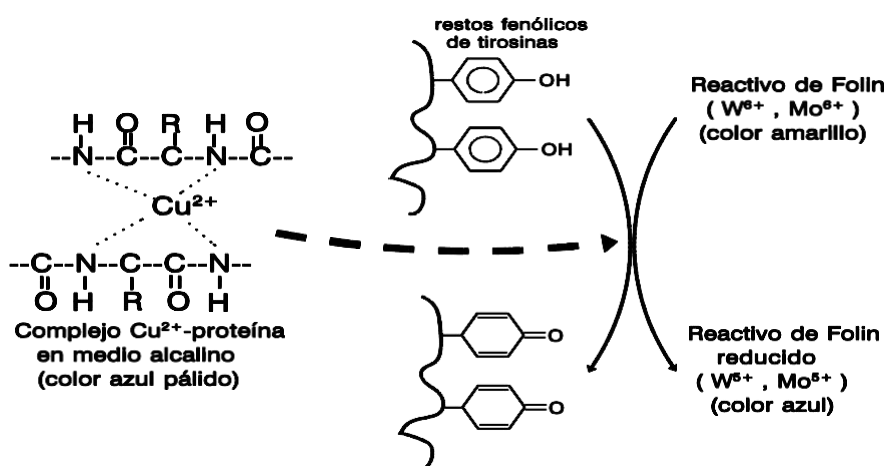
El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas según la ley de Lambert-Beer (ver apartado de fotometría).

Este método consta de dos etapas: en la primera, los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura

tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso.

La reacción que tiene lugar entre las proteínas y el reactivo se puede representar de la forma siguiente:



Material

- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Espectrofotómetro
- Cubetas de medición.

Reactivos

- Reactivo A: Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0,1 M
- Reactivo B₁: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%
- Reactivo B₂: tartrato sódico-potásico al 2%
- Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B₁ y B₂ en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen)
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido a 1/4
- Solución patrón: albúmina de suero bovino (1 mg/ml)

Procedimiento experimental

Para construir la curva de calibración, tomar diferentes volúmenes de una solución de albúmina de suero bovino (1 mg/ml) tal y como se detalla en el cuadro. La concentración que tienen las muestras problema se determina por interpolación de sus valores de absorbancia en la curva patrón. El primer tubo, que sólo contiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia.

Pasos a seguir:

- a- Enumerar 6 tubos de Kahn del 1 al 6, por duplicado.
- b- Preparar el reactivo C, a partir de los reactivos A, B₁ y B₂ en las proporciones indicadas en “Reactivos”.
- c- Adicionar el volumen de agua, solución patrón de albúmina o muestra, indicados en la tabla que sigue a continuación.
- d- Adicionar a todos los tubos el reactivo C. Mezclar el contenido de cada tubo y dejarlo reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- e- A continuación, añadir a todos los tubos el reactivo de Folin (diluido 1/4), mezclando bien. Dejar reposar 30 minutos para que se desarrolle completamente la reacción coloreada.
- f- Leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 750 nm. Previamente el aparato se ajusta a A=0 con el blanco (tubo nº 1); de esa forma sólo se mide el color producido por las proteínas, puesto que se resta el color debido a los reactivos.
- g- Obtener la curva de calibración representando en ordenadas las absorbancias, corregidas y promediadas, de los tubos 1 a 6 frente a la concentración (o cantidad) de proteína en cada tubo, que previamente se ha calculado a partir de la concentración del patrón de albúmina (1mg/ml) y los volúmenes utilizados en cada tubo.

Reactivos \ Tubos	1-1'	2-2'	3-3'	4-4'	5-5'	6-6'
Agua	0,4 ml	0.38 ml	0.36 ml	0.34 ml	0.32 ml	0.3 ml
Testigo Albúmina (1mg/ml)	-	20 ul	40 ul	60 ul	80 ul	100 ul
Reactivo C	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Mezclar y dejar 10 min a temperatura ambiente.						
Reactivo de Folin (dil. 1/4)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Mezclar y dejar 30 min a temperatura ambiente.						
Abs a 750 nm						

DISEÑO DE MODELO ANIMAL PARA LOS TRABAJOS PRACTICOS DE LABORATORIO

Estados metabólicos: ayuno y realimentación

MODELO EXPERIMENTAL

Se utilizarán seis animales adultos del mismo sexo, que serán divididos en 3 grupos: control, ayunados y realimentados. El grupo ayuno será ayunado por 12 hs, posteriormente serán sacrificados por decapitación bajo adormecimiento con CO₂. El grupo realimentado tendrá acceso al alimento durante 2h luego del ayuno, al término de este período serán sacrificados igual que el grupo ayuno. El grupo control será sacrificado sin ayuno. En los tres grupos se recolectará la sangre con heparina para obtener el plasma, y el hígado será reservado a -20°C. El plasma será alicuotado y guardado a -20°C, en algunos casos cubierto con papel de aluminio para evitar la degradación de metabolitos.

Para cada grupo los alumnos realizarán las siguientes determinaciones:

- 1- Metabolismo de hidratos de carbono: glucemia. Actividad de LDH
- 2- Metabolismo de lípidos: colesterol y triglicéridos plasmáticos. Lipidograma electroforético.
- 3- Metabolismo de aminoácidos: actividad de transaminasas por métodos coloriméticos y cinéticos en plasma e hígado.
- 4- Metabolismo de nucleótidos: determinación de ácido úrico.
- 5- Integración de los datos obtenidos, explicación metabólica de los mismos.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°2

METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y ACTIVIDAD DE LDH EN PLASMA

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Comprender el fundamento teórico de las técnicas para la determinación de glucosa y de actividad de LDH, en plasma de un modelo animal.
- ✓ Adquirir destreza en el uso del material e instrumental del laboratorio.
- ✓ Interpretar los resultados obtenidos a partir del dato experimental.

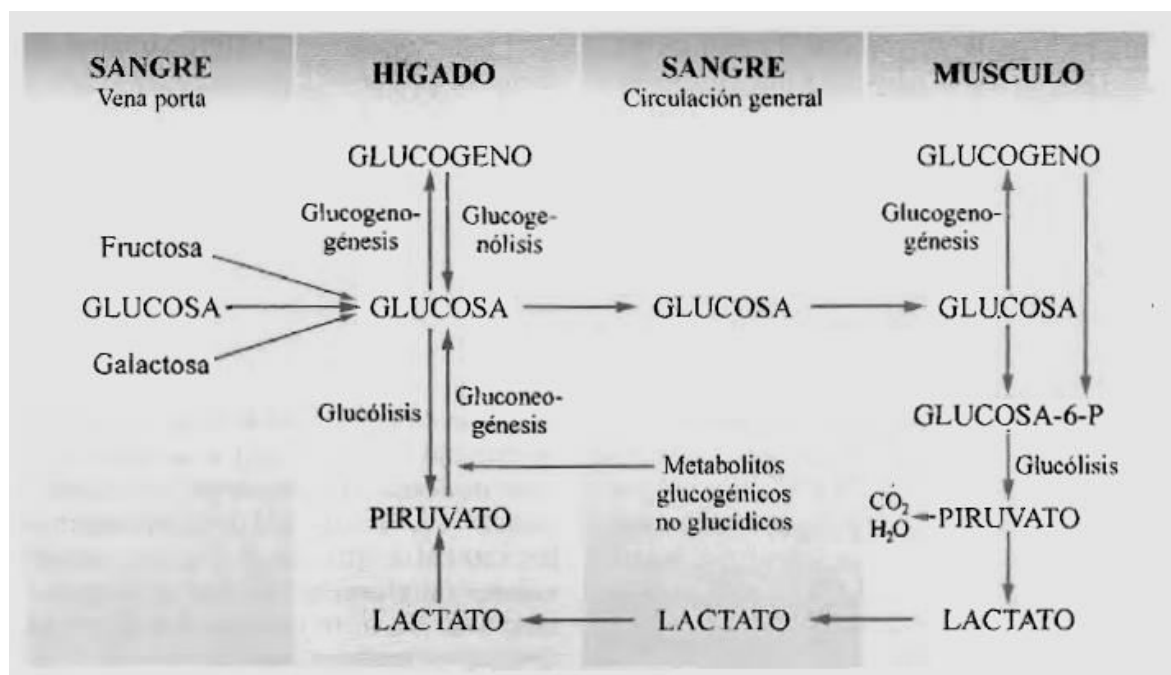
Introducción teórica

Los hidratos de carbono representan una parte importante de la dieta, estos sufren procesos digestivos hasta monosacáridos, son absorbidos en la mucosa intestinal y metabolizados en las células. Glucosa es el monosacárido mayoritario, también se encuentra fructosa y galactosa. Luego de la absorción, los monosacáridos son mayormente transportados al hígado por la vena porta, allí son metabolizados para dar intermediarios comunes a los obtenidos desde glucosa.

La principal función de glucosa es oxidarse para producir energía utilizable, además de servir de materia prima para la síntesis de distintos compuestos útiles para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los organismos.

El hígado capta gran parte de la glucosa y la almacena en forma de glucógeno. Todos los tejidos reciben un aporte continuo de glucosa y algunos tienen capacidad para sintetizar y almacenar glucógeno, sin embargo, estos procesos son más significativos en hígado y músculo. El glucógeno hepático es degradado hasta glucosa en un proceso llamado glucogenólisis, el cual es un importante mecanismo para mantener constante el nivel de glucosa en sangre en los intervalos entre las comidas. Este mecanismo es vital, especialmente para el sistema nervioso central, ya que éste depende exclusivamente de la glucosa sanguínea para obtener la energía, como así también los eritrocitos que carecen de mitocondrias.

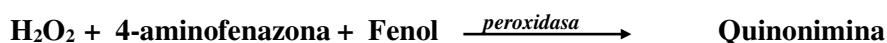
El músculo, en cambio, degrada el glucógeno para el trabajo contráctil; a diferencia de hígado, no cede glucosa libre a la circulación sino que ésta se oxida hasta piruvato y lactato. En condiciones de suficiente suministro de oxígeno, el piruvato formado en músculo es oxidado hasta CO_2 y H_2O . Sin embargo, en condiciones de actividad contráctil intensa la provisión de oxígeno no alcanza y el piruvato formado es reducido a lactato, por acción de la enzima citosólica Láctico Deshidrogenasa (LDH), para regenerar el NAD^+ y mantener en funcionamiento la vía glicolítica y la provisión de ATP, en condiciones de anaerobiosis. El lactato, pasa a la sangre y es captado por el hígado donde se convierte nuevamente en piruvato por la LDH hepática y por gluconeogénesis se utiliza para sintetizar glucosa y glucógeno, que puede ser utilizado cuando el organismo lo requiera. Este proceso cíclico se denomina **Ciclo de Cori**.



En el trabajo práctico, se determinarán parámetros del metabolismo de carbohidratos, tales como los niveles de glucosa y la actividad de LDH en plasma. La LDH es una enzima citosólica que presenta valores basales en plasma debidas al recambio normal celular, valores incrementados indican daño tisular. El origen del daño puede determinarse por la isoenzima de LDH presente en plasma, ya que la expresión de isoenzimas es característica de tejido.

a) Determinación de glucosa

Fundamento del método: La glucosa es oxidada enzimáticamente por la *glucosa oxidasa* (GOD) a ácido glucónico y H_2O_2 , el cual en presencia de una *peroxidasa* (POD) produce la copulación oxidativa de fenol con 4-aminofenazona dando lugar a la formación de un cromógeno rojo con absorbancia a 505 nm de acuerdo a la siguiente reacción:



La quinonimina es un compuesto de color rojo que tiene un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos:

- Standard: solución de glucosa 1g/l
- GOD/POD: solución de glucosa oxidasa (1000U/l) y peroxidasa (120 U/l)
- 4-AF: solución de 4-aminofenazona (25 mmol/l) en buffer tris.
- Fenol: solución de fenol (55 mmol/l)

Muestra: plasma

Técnica:

TUBOS	BLANCO	TESTIGO	MUESTRA
Muestra (μl)	----	--	10
Testigo (μl)	----	10	---
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1

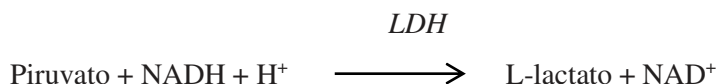
Mezclar e incubar 10 min a 37 °C. Leer a 505nm.

Cálculo de los resultados: Corregir las lecturas de absorbancia restando el valor obtenido en el tubo blanco al resto de los tubos. Determinar la concentración de glucosa del tubo muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Glucosa g/l: Abs. M corregida} \times f = \frac{1,00 \text{ g/l}}{\text{Abs. Std. Corregida}}$$

b) Determinación de actividad de LDH

Fundamentos del método: Basado en el siguiente esquema de reacción:



Reactivos

-Reactivo A: viales conteniendo NADH.

-Reactivo B: solución de buffer Tris, pH 7,2 conteniendo piruvato y cloruro de sodio.

Concentraciones finales

Tris 80 mM, pH 7,2

Piruvato 1,6 mmol/l

NADH 0,2 mmol/l

ClNa 200 mmol/l

Instrucciones para su uso

Reactivo A: agregar el volumen de Reactivo B indicado en el rótulo a un vial de Reactivo A. Tapar y agitar suavemente por inversión hasta disolución completa. Fechar.

Reactivo B: listo para usar.

Indicios de inestabilidad o deterioro de los reactivos: Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, lecturas de absorbancia del Reactivo A reconstituido inferiores a 0,800 D.O. o superiores a 1,800 D.O. (a 340 nm) son indicio de deterioro del mismo.

Muestra: Suero o plasma, obtenido de la manera usual. En caso de que la muestra a emplear sea plasma, debe usarse heparina como anticoagulante. Las muestras con hemólisis visible o intensa pueden producir valores falsamente aumentados por lo que no deben ser usadas. La muestra debe ser preferentemente fresca. La LDH es estable hasta 24 horas en refrigerador. No congelar.

Técnica:

En una cubeta mantenida a la 37°C, colocar:

- **Reactivo A reconstituido** : 1 ml

Preincubar unos minutos, luego agregar:

- **Muestra** 20 ul

Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 30 segundos. Leer la absorbancia inicial y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinarla diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

Cálculo de los resultados

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{factor}$$

El factor depende de la temperatura de reacción y de la técnica empleada, en este caso para 37 °C y con los volúmenes utilizados **f: 8,095**

Importante: si la absorbancia inicial es baja, una vez agregado el suero, la primera lectura (tiempo 0) inferior a 0,800 D.O. estando el sustrato (Reactivo A) en condiciones, indica una muestra con muy alta actividad de LDH (que consume NADH aún antes de esta lectura). En este caso, repetirla determinación con muestra diluida 1/10 con solución fisiológica y multiplicar el resultado por la dilución efectuada.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°3 METABOLISMO DE LÍPIDOS

Determinación de Triglicéridos y colesterol total.

Separación de Macromoléculas por Electroforesis en Gel de Agarosa: Lipidograma

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Comprender el metabolismo de los triglicéridos y colesterol.
- ✓ Adquirir destreza en las técnicas de determinación de triglicéridos y colesterol por métodos colorimétricos y en la separación de macromoléculas por electroforesis en gel de agarosa.

Introducción

Los lípidos son moléculas orgánicas que se caracterizan por su hidrofobicidad, su estructura química es muy diversa y desempeñan funciones biológicas variadas: almacenamiento de energía química, componentes estructurales de membrana, protección, vitaminas, hormonas, mensajeros intracelulares.

De acuerdo a la distribución tisular y funciones podemos distinguir lípidos de depósito y constitutivos. Los lípidos de depósito se encuentran en el tejido adiposo subcutáneo y en el que rodea algunos órganos, están constituidos en su mayoría por triacilglicéridos, una pequeña parte de colesterol y lípidos complejos. Su función es servir de reserva energética, además de actuar como aislante térmico y cubierta protectora o sostén de órganos. Los lípidos constitutivos forman parte de las membranas y otras estructuras celulares, comprenden principalmente fosfolípidos, glucolípidos y colesterol.

Los triacilgliceroles deben hidrolizarse para que la célula pueda utilizarlos, tanto los que se encuentran en los lípidos de depósito como los que son transportados por lipoproteínas (Quilomicrones y VLDL). En tejido adiposo hay una permanente degradación de los triacilgliceroles llamada lipólisis, y es catalizada por *lipasas* intracelulares que son reguladas de acuerdo a los requerimientos del organismo. Como resultado de esta lipólisis se obtienen ácidos grasos libres y glicerol que se liberan al plasma, los primeros se unen en el plasma a la albúmina para ser transportados hacia los tejidos. Los triacilgliceroles transportados por lipoproteínas son hidrolizados en los capilares sanguíneos por acción de la *lipoproteinlipasa*, los ácidos grasos ingresan a las células y el glicerol es captado por las células que contienen el sistema enzimático para su utilización.

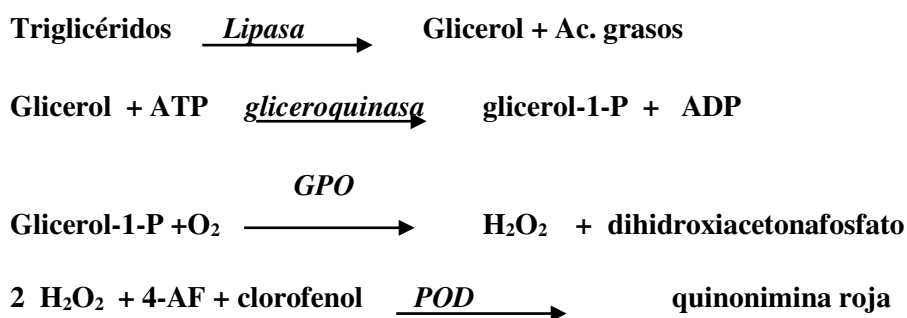
El colesterol es sintetizado por casi todos los tejidos, principalmente hígado, además de intestino, gónadas, glándula suprarrenal, piel, músculo y tejido adiposo. Se debe considerar también el colesterol que es ingresado por la dieta diariamente. Es absorbido en intestino en estado libre y es esterificado dentro de las células de la mucosa, principalmente con ácido oleico, en una reacción

catalizada por la *acil-CoA-colesterol transferasa* (ACAT). Los ésteres del colesterol exógeno son incorporados, junto con los triacilgliceroles, en los quilomicrones y enviados a la sangre, donde son degradados por acción de la *lipoproteínlipasa*, las partículas residuales o remanentes, que contienen colesterol esterificado, son captadas por el hígado para su degradación final a ácidos biliares. El colesterol circula en plasma unido a diferentes lipoproteínas, pero la mayor parte está asociada a LDL (lipoproteína de baja densidad), dos terceras partes del total se encuentra esterificado. La esterificación es catalizada por la *lecitina-colesterol-aciltransferasa* (LCAT) en las HDL (lipoproteínas de alta densidad), estas lipoproteínas reciben el colesterol libre extrahepático, lo esterifican y transfieren a VLDL y quilomicrones intercambiándolo por triacilgliceroles; este proceso requiere de una proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) y se conoce como transporte reverso de colesterol. Las LDL se unen a receptores específicos y son internalizadas por endocitosis, los ésteres de colesterol son degradados en lisosomas y los productos liberados al citosol. El nivel de colesterol intracelular tiene actividad regulatoria a distintos niveles: a) el aumento de colesterol inhibe la vía de síntesis a nivel de la enzima *Hidroximetilglutaril-Co A reductasa*; b) el exceso de colesterol es almacenado como ésteres de colesterol, por acción de la ACAT; c) el aumento de colesterol inhibe la síntesis del receptor de LDL.

En el trabajo práctico realizaremos una evaluación de los niveles plasmáticos de colesterol y triacilgliceroles, además del estudio de las lipoproteínas plasmáticas por electroforesis, en distintas condiciones de metabólicas de ayuno o alimentación.

A- Método enzimático colorimétrico, GPO/ PAP AA (Wiener lab)

Fundamento del método: El método se fundamenta en el siguiente esquema de reacción:



Condiciones de trabajo: Temperatura de reacción: 37 °C, tiempo de reacción: 5 min., pH 7,5

Reactivos: El equipo provee los siguientes reactivos:

-Testigo: solución de glicerol (equivale a 2 g/l de trioleína)

-Enzimas: Viales conteniendo Lipoprotein lipasa, Gliceriquinasa, Glicerol fosfato oxidasa, Peroxidasa, ATP y 4- aminofenazona.

-Buffer: Solución de buffer conteniendo clorofenol, pH 7.5

Muestra: Suero o plasma

Técnica:

TUBOS	BLANCO	TESTIGO	MUESTRA
Muestra (μl)	----	--	10
Testigo (μl)	----	10	---
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1

Mezclar, incubar 5 minutos en baño de agua a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente. Enfriar y leer a 505 nm llevando a cero el aparato con agua destilada.

El color de reacción es estable 60 minutos.

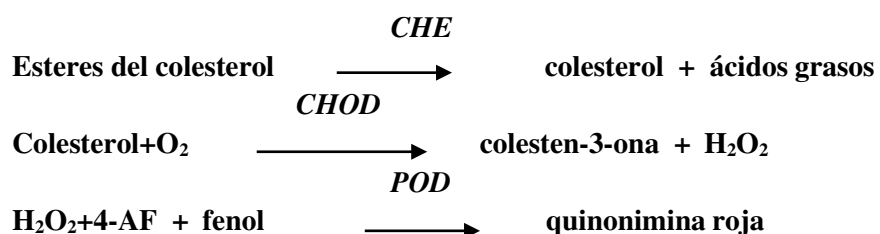
Cálculo de los resultados:

$$\text{TG g/l} = D \times \text{factor} \quad \text{factor} = \frac{2 \text{ gr/l}}{T}$$

$$M = \text{Abs}_M - \text{Abs}_B \quad T = \text{Abs}_T - \text{Abs}_B$$

B- Determinación de Colesterol Total: Método enzimático.

Fundamento del método: El colesterol es oxidado enzimáticamente por la *colesterol oxidasa* (CHOD) previa hidrólisis de los ésteres mediante una *colesterol esterasa* (CHE). El agua oxigenada generada en presencia de fenol reacciona con la 4-aminofenazona mediante una reacción catalizada por una *peroxidasa* (POD). El producto coloreado tiene su absorbancia máxima a 505 nm.



Técnica:

TUBOS	BLANCO	TESTIGO	MUESTRA
Muestra (μl)	----	--	10
Testigo (μl)	----	10	---
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1

Mezclar por rotación. Dejar 15 minutos a temperatura ambiente. Leer en espectrofotómetro a 505 nm.

Cálculo de los resultados:

$$\text{Colesterol total (mg/dl)} = \text{Absorbancia de la Muestra} \times f \quad f = \frac{200 \text{ mg/dl}}{A_{\text{testigo}}}$$

C- LIPODOGRAMA ELECTROFORÉTICO

Las **lipoproteínas plasmáticas** se pueden separar en función de su diferente movilidad en un campo eléctrico. Utilizando **gel de agarosa**, se obtienen fracciones (coincidentes con la ultracentrifugación, considerado método patrón) que migran en distintas bandas: **α-(HDL)**, **pre-β (VLDL)** ó **β (LDL)**. Las partículas con mayor carga negativa (α) son las que se mueven más rápidamente. Los quilomicrones, que son segregados en el estado postprandial pueden verse atrapados en el origen.

Materiales:

➤ **Buffer veronal-veronal sódico 0,05 M; pH = 8,6.** Disolver 10,3 g de veronal sódico; 1,34 g de veronal en 700 ml de agua destilada, calentando si es necesario, completar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar con HCl si fuera necesario. Conservar a 4°C.

➤ **Solución de agarosa (0,6 % p/v).** La agarosa es un polímero lineal de galactosa que se obtiene por procesos de acetilación y saponificación del agar.

Disolver 0,6 g de agarosa en 100 ml de Buffer veronal-veronal sódico, calentando hasta disolución total, hasta comienzo de ebullición, fraccionar en tubos y guardar a 4°C. La solución solidificada se conserva durante aproximadamente 20 días.

➤ **Solución fijadora:** Etanol: Metanol : Isopropanol : Agua (45 : 1 : 1 : 20).

➤ **Colorante: Sudán Black** tiñe los lípidos reaccionando en primer lugar con las uniones ésteres de triglicéridos y colesterol. Como las fracciones de las lipoproteínas toman el colorante con diferente intensidad las bandas no son cuantificables.

Disolver 0,4 g de Sudán Black, 4 g de Acetato de Zn y 120 ml de etanol absoluto en 80 ml de agua destilada. Primero se disuelve en agua el acetato y por separado el colorante en etanol. Dejar reposar y filtrar antes de usar.

- **Soporte: portaobjetos** de 7 x 2,6 cm, perfectamente limpios y desengrasados con alcohol 70%.
- **Trozos de agujas** de 0,9 mm de diámetro cortadas en los extremos logrando 18 cm de longitud.
- **Puentes de papel de filtro** embebidos en Buffer veronal-veronal sódico. Conservar a 4°C.
- **Muestra:** la determinación se efectúa utilizando el **plasma**, recogiendo la sangre con solución de **EDTA al 5% en proporción de 0,1 ml para 1 ml de sangre** (el EDTA es el anticoagulante de preferencia ya que retarda la autooxidación de los lípidos y la degradación oxidativa de las apoproteínas, particularmente la de la ApoB). **También puede usarse suero.** La muestra debe **conservarse a 4°C. No deben ser congeladas** porque se alteran las estructuras de los QM y VLDL.

Técnica:

a) Sobre **un portaobjetos limpio y desengrasado** con alcohol, distribuir con una pipeta **1,8 ml de la solución de agarosa**, calentada a baño María. Inmediatamente, colocar a 2 cm del borde un trozo de aguja, cuidando de hacerlo antes que solidifique el gel. Esperar 10 min. y retirar la aguja con un imán.

b) En la canaleta así formada **sembrar alrededor de 10 µl de suero** con una micropipeta.

Una de las muestras debe ser coloreada con azul de bromofenol (una punta de espátula cada 10 ml de metanol). El azul de bromofenol ha sido empleado para la tinción de las bandas proteicas en agarosa, da un color **más intenso** con la albúmina (proteína plasmática de mayor PM) que con las globulinas, por tal razón cuando se mezcla con el suero para sembrar como **testigo de corrida**, ésta va a ir primero antes de las HDL. Controla el frente de corrida.

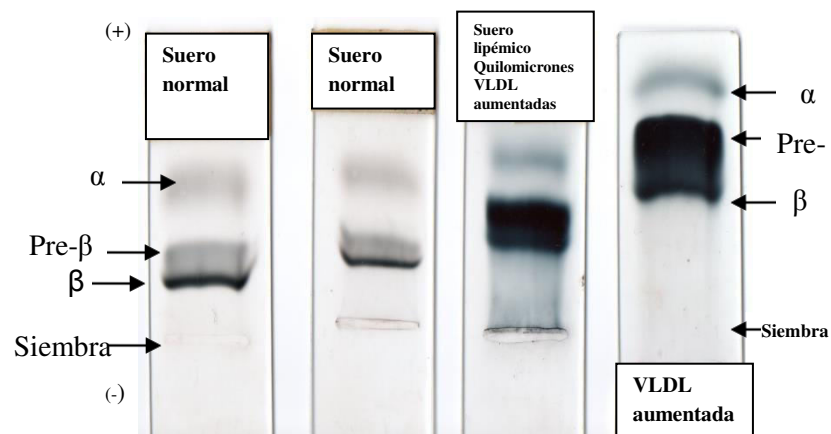
c) Colocar los **portaobjetos con las muestras en la cuba de electroforesis** y hacer conexiones con el Buffer por medio de **puentes de papel de filtro**. Aplicar el amperaje adecuado (3 o 5 mA/portaobjeto). **La electroforesis se detiene cuando la banda de azul de bromofenol se ha desplazado 4 cm (3 hs. aprox.).**

d) Sumergir los portaobjetos en la **solución fijadora** durante por lo menos 2 hs. Retirarlos, cubrirlos con papel de filtro mojado con agua destilada y colocarlos en **estufa entre 55°C – 60°C hasta lograr el secado correcto y la deshidratación de la agarosa.**

e) Luego se sumergen los portaobjetos en **colorante 2 hs.** Lavarlos bajo chorro de agua destilada y dejarlos secar al aire.

De la observación de las bandas, realizar la evaluación semicuantitativa del lipidograma.

LIPIDOGRAMA ELECTROFORETICO (Lab Química Bológica, cortesía Dra Silvia Varas)



TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4:
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
DETERMINACIÓN DE GLUTÁMICO-OXALACÉTICO TRANSAMINASA Y
GLUTÁMICO-PIRÚVICO TRANSAMINASA (GOT Y GPT)

Objetivos

Que el alumno logre:

- ✓ Comprender la acción de las aminotransferasas GOT y GPT, su ubicación celular y tisular y el significado metabólico del aumento de su actividad en plasma.
- ✓ Conocer el fundamento teórico de las técnicas de determinación de actividad de transaminasas.
- ✓ Adquirir destreza en técnicas de determinaciones de actividad enzimática colorimétricas y cinéticas.

Introducción

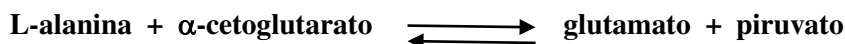
Las aminotransferasas son enzimas ampliamente difundidas en el organismo, que catalizan la transferencia de un grupo amino de un aminoácido a un cetoácido, en una de las más importantes reacciones del metabolismo proteico. Estas enzimas son intracelulares y por lo tanto la actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. Un aumento de la actividad sérica será evidencia de un deterioro de los tejidos en que se encuentran.

La **aspartato amino transferasa o glutámico oxalacético transaminasa (GOT)** es una enzima citoplasmática y mitocondrial que está ampliamente distribuida en el organismo, en tejidos tales como músculo esquelético, riñón, cerebro y fundamentalmente hígado y corazón, donde se encuentra en mayor concentración. Cualquier alteración de estos tejidos, que implique un aumento de la permeabilidad o rotura de las membranas celulares, produce un aumento en los niveles de GOT circulante, en forma proporcional al grado del daño.

La **alanina amino transferasa o glutámico pirúvico transaminasa (GPT)** es una enzima citoplasmática cuya mayor actividad se localiza en el **tejido hepático**. En mucha menor proporción, se encuentra actividad de GPT en músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas e eritrocitos. De tal forma, la destrucción o cambio de permeabilidad de las membranas celulares en los tejidos antes mencionados, provoca la liberación de GPT a la circulación sanguínea. Teniendo en cuenta su distribución, los mayores aumentos de actividad de GPT en suero, se producen como consecuencia de alteraciones hepáticas tales como colestasis, hepatitis tóxicas o virales.

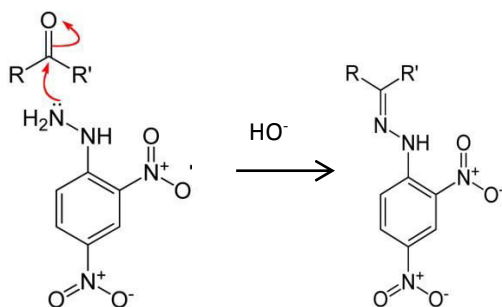
A) MÉTODO COLORIMÉTRICO (Reitman y Frankel) (Equipo de laboratorio Wiener)**Fundamento del método:**

Teniendo en cuenta que la GPT cataliza la siguiente reacción:



y que la cantidad de piruvato formado está relacionado directamente con la actividad de la enzima en suero, la determinación del producto de reacción en una medida de la misma. El piruvato formado reaccionan con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4 DNFH) produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado cuya absorbancia se mide a 505 nm.

α -CETOÁCIDO



2,4 DINITROFENILHIDRACINA

2,4 DINITROFENILHIDRAZONA

Condiciones de trabajo: Temperatura: 37°C, pH 7.4

Reactivos: El equipo provee los siguientes reactivos:

- Sustrato GPT: L-alanina, α -cetoglutarato y buffer fosfato pH 7.4
- Reactivo de color: 2,4 dinitrofenilhidrazina y HCl concentrado
- NaOH 0.4 M

Muestras: Se utilizarán dos muestras de diferente origen: M1) plasma de rata no hemolizado, M2) homogenato de hígado.

Obtención de homogenato de hígado de rata:

Tomar 2 gr de hígado de rata, homogenizar con 5 ml de buffer fosfato pH 7,0. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm, descartar el precipitado, del sobrenadante tomar 2 ml de muestra y llevar a 10 ml con buffer fosfato. De esta muestra hacer una dilución 1/20 para realizar la determinación de transaminasas por el método colorimétrico, si la lectura de absorbancia supera el valor de 0,800nm realizar una dilución mayor de la muestra.

Técnica: Utilizar para cada reacción 4 tubos marcados, B1 (Blanco de plasma), B2 (Blanco de homogenato de tejido, D1(plasma) y D2 (homogenato de tejido diluido 1/20):

	B (1)	B (2)	D1	D2
Sustrato GPT	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
Suero			50 μ l	
Homogenato				50 μ l

Incubar todos los tubos 30 minutos a 37°C

2,4 DNPH	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml
----------	---------	---------	---------	---------

M1 y M2	50 µl	50 µl		
Incubar todos los tubos 10 minutos a 37°C				
Na OH 0,4 N	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Mezclar por inversión, leer en fotolorímetro o espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con agua destilada. El color es estable durante 30 min.

Cálculo de los resultados:

- Utilizando curva de calibración, para **muestras de suero**:

La diferencia de lectura entre D y B es proporcional a la actividad de la enzima presente en la muestra. Esta diferencia se transporta a la curva de calibración previamente confeccionada, obteniéndose el resultado directamente en U/l .

- Utilizando curva de calibración, para muestra de **homogenato de tejido**:

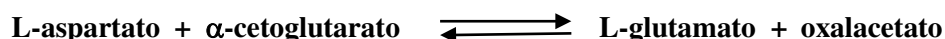
Se realiza de la misma manera que el de las muestras de suero, pero el valor de U/l obtenido de la curva de calibración debe multiplicarse por el valor de la dilución realizada a la muestra.

Si la actividad de la muestra de suero fuera mayor de 77 U/l de GOT o GPT debe repetirse la determinación diluyendo previamente la muestra con solución fisiológica y el valor de la actividad de la enzima debe multiplicarse por la dilución realizada.

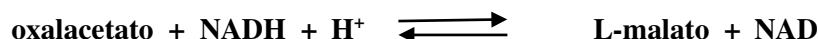
B) MÉTODO CINÉTICO EN UV (Equipo de laboratorio Wiener o Boehringer)

Fundamento del método: La determinación de la actividad de **GOT** por el método cinético se basa en el siguiente esquema reaccionante.

GOT cataliza la siguiente reacción:



MDH (*Malato deshidrogenasa*) cataliza la siguiente reacción:



La reacción principal, catalizada por la GOT, está desplazada hacia la formación de oxalacetato. Este, reacciona inmediatamente con la MDH, de modo que la velocidad de oxidación del NADH, medida a 340 nm, es proporcional a la actividad de GOT de la muestra. En el medio de reacción, además hay LDH (Lactato deshidrogenasa) suficiente para consumir los cetoácidos de origen endógeno, evitando así su interferencia.

Condiciones de trabajo: Temperatura: 25°C, pH 7.8

Reactivos: El equipo provee los siguientes reactivos:

-Solución Buffer/Sustrato: conteniendo Buffer Tris pH 7.8 y L-aspartato

-Enzima/Coenzima/ α -cetoglutarato: cada comprimido contiene: MDH, LDH, NADH y α -cetoglutarato.

Disolver un comprimido del reactivo 2 en 2 ml de solución Buffer (reactivo 1).

Muestra: Suero fresco no hemolizado.

Técnica: En una cubeta mantenida a 25°C colocar:

Solución reactiva: 1,0 ml

Preincubar unos minutos, luego agregar:

Muestra (suero): 100 μ l

Mezclar y al cabo de aproximadamente 1 minuto leer la absorbancia inicial y disparar simultáneamente el cronómetro. Repetir las lecturas exactamente 1', 2' y 3'.

Determinar la diferencia promedio de $\Delta A/\min$ ($\Delta A/\min$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

Cálculo de los resultados: con las lecturas obtenidas completar el siguiente cuadro:

Tiempo	0	1'	2'	3'
Abs. 340 nm				
$\Delta A/\min$				
Promedio: $\Delta A/\min$:			

Cálculo de la actividad de GOT:

$\text{GOT (U/l)} = \Delta A/\min \times \text{factor}$

Cada equipo determina el factor correspondiente a una determinada longitud de onda y temperatura. Si una vez agregado el suero, la primer lectura (tiempo 0) es inferior a 0.800 D.O., estando el sustrato en condiciones, indica que la muestra posee muy alta actividad de GOT (que consume NADH aún antes de esa lectura) o contiene una concentración de cetoadidos endógenos particularmente elevada. En este caso, diluir el suero 1/10 con solución fisiológica y repetir la determinación multiplicando el resultado por la disolución efectuada.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°5

DETERMINACIÓN DE ACIDO URICO

Objetivos

Que el alumno sea capaz de:

- ✓ Comprender el proceso de degradación de nucleótidos.
- ✓ Adquirir destreza en técnicas de cuantificación de ácido úrico en plasma.
- ✓ Interpretar los resultados obtenidos a partir del dato experimental.

Introducción

El ácido úrico es un metabolito de las purinas, ácidos nucleicos y nucleoproteínas. La concentración de ácido úrico en suero depende de distintos factores como sexo, raza, dieta, constitución genética, embarazo, etc.

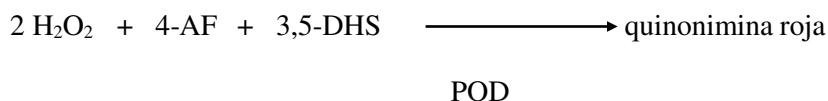
Distintos desórdenes metabólicos están acompañados de hiperuricemia, tales como leucemia, policitemia, mieloma múltiple, intoxicación plúmbica, por tratamiento con citostáticos ó con tiazida, pero es típica de la artritis gotosa, cuando los niveles de ácido úrico son mayores de 90 mg/l los cuales se cristalizan al igual que sus sales en las articulaciones y tendones de tales pacientes, causando las manifestaciones reumatológicas características.

También es posible encontrar depósitos de uratos en los túbulos renales o en el tejido intersticial del parénquima renal con el consecuente riesgo de una insuficiencia renal en caso de persistir la hiperuricemia.

Se ha observado en investigaciones recientes que las soluciones de referencia de ácido úrico preparadas con timerosal o estreptomina como agente preservante, pueden ser evaluadas por el método espectrofotométrico indirecto mediante una reacción química o enzimática. La información obtenida, en cuanto a la estabilización de las soluciones de referencia del urato, resulta de vital importancia para el desarrollo de la tecnología de producción de éstas. Las sustancias antibacterianas probadas no garantizan por sí solas la protección de las soluciones que se someten a riesgo de contaminación micótica en el trabajo diario, por lo que se recomienda estudiar la posibilidad de combinar los agentes antibacterianos con agentes antimicóticos.

Fundamento del método

El ácido úrico es degradado enzimáticamente por la uricasa (UOD: Urato oxígeno reductasa) a alantoína con producción de dióxido de carbono y agua oxigenada. El agua oxigenada generada en la oxidación reacciona con la 4-amino fenazona (4-AF) y el 3,5 diclorohidroxibenceno sulfónico (3,5-DHS) dando lugar a la formación de una quinonimina roja:



Reactivos

-Standard: Solución de ácido úrico 100 mg/l.

-Reactivos: Uricasa, peroxidasa, diclorohidroxibenceno sulfónico (DHS), 4-Aminofenazona y ferrocianuro de potasio

-Reactivo de Trabajo: Preparar de acuerdo a las instrucciones del equipo.

Muestra

Suero fresco. Puede conservarse hasta 3 días en congelador.

Interferentes: Sueros ictericos o con hemólisis visible dan valores falsamente aumentados. Los calmantes o analgésicos fuertemente reductores tales como ácido ascórbico, buscapina, etc. suministrados en dosis elevadas consumen H_2O_2 , dando valores falsamente disminuídos, razón por la cual el paciente deberá suspender la medicación 12 hs. antes de la extracción de sangre.

Técnica: Trabajar siguiendo el siguiente protocolo:

	B	T	D
Muestra	-	-	20µl
Testigo	-	20 µl	-
Reactivo de trabajo	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar suavemente e incubar 15 min. a 37°C . Leer a 505 nm, llevando a cero con el blanco.

Cálculo de los resultados

$$\text{Ácido Úrico mg/l} = D \times f$$

$$f = 100 \text{ mg/l} / S$$

INFORME FINAL DE LABORATORIO

	CONTROL	AYUNO	AYUNO Y REALIMENTACIÓN
GLUCOSA			
LDH			
COLESTEROL TOTAL			
TRIGLICÉRIDOS			
LIPIDOGRAMA			
GOT PLASMA			
GPT PLASMA			
GPT HÍGADO			
ACIDO URICO			

- 1) Con los conocimientos adquiridos hasta el momento explique los resultados obtenidos.
- 2) ¿Qué otras determinaciones propone realizar para completar la comprensión de las vías metabólicas en estudio?

BIBLIOGRAFÍA

- BLANCO, A., "Química Biológica", Ed. El Ateneo, 8ª ed. (2007).
- LEHNINGER, A.L., "Principios de Bioquímica", Ed. Omega, 4ª ed. (2008).
- MCKEE & MCKEE, la base molecular de la vida, 3ª. Ed, (2003).
- VOET, VOET, PRAT, "Fundamentos de Bioquímica", Ed. Panamericana, 2da. Ed. (2006).
- MURRAY, GRANNER, MAYER y RODWELL, "Bioquímica de Harper", Ed. El Manual Moderno, 13ª ed. (1994) y 14ª ed. (1997).
- MONTGOMERY, CONWAY, SPECTOR Y CHAPPELL- "Bioquímica – Casos y texto"- Editorial Harcourt Brace, 6º ed.- 1999.
- STRYER, L "Bioquímica", Tomos I y II, Ed. Reverté S.A., 4º Ed. (1995).
- BENYON,S. "Metabolismo y nutrición". Harcourt Brace (1998)